

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/00233

REC'D 10 MAR 2000

WIPO 01.06T

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 1月19日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第011218号

出願人

Applicant(s):

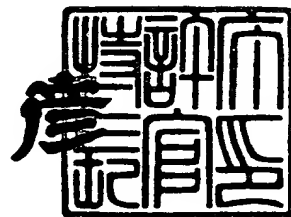
株式会社エイジーン研究所

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 2月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3009527

【書類名】 特許願

【整理番号】 A1-003

【提出日】 平成11年 1月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地 株式会社エイジーン研究所内

【氏名】 北尾 紗織

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地 株式会社エイジーン研究所内

【氏名】 嶋本 顕

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地 株式会社エイジーン研究所内

【氏名】 古市 泰宏

【特許出願人】

【識別番号】 596013888

【氏名又は名称】 株式会社エイジーン研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ロスムンドートムソン症候群の原因となる遺伝子および遺伝子産物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA。

【請求項 2】 請求項 1 に記載のゲノムDNAを含むベクター。

【請求項 3】 請求項 2 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 4】 RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスムンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNA。

【請求項 5】 RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬。

【請求項 6】 RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬。

【請求項 7】 RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群検査薬。

【請求項 8】 RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域の変異を検出することを特徴とする、ロスムンドートムソン症候群の検査方法。

【請求項 9】 請求項 8 に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) 請求項 4 に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、

(c) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

【請求項 10】 請求項 8 に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者からRNA試料を調製する工程、

(b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、

(c) 請求項 4 に記載の DNA をプローブとして用いて、分離した RNA に対しハイブリダイズさせる工程、

(d) ハイブリダイズした RNA を検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

【請求項 1 1】 請求項 8 に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) 請求項 4 に記載の DNA をプライマーとして用いて患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程、

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程、

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法。

【請求項 1 2】 請求項 8 に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) RecQ4 ヘリカーゼをコードする DNA またはその発現調節領域中におけるロスマンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 増幅した DNA 断片を検出する工程、を含む方法。

【請求項 1 3】 請求項 8 に記載のロスマンドートムソン症候群を検査する方法であって、

(a) 患者から DNA 試料を調製する工程、

(b) ロスマンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製された一対の請求項 4 に記載の DNA をプライマーとして用いて、患者由来の DNA を増幅する工程、

(c) 得られた増幅産物に対し、下記の (i) から (iv) のいずれかの一対のオリゴ

ヌクレオチド；

(i) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が 3' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該 3' 末端の隣りの塩基 (3' 側) が 5' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(ii) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が 3' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該 3' 末端の隣りの塩基 (3' 側) が 5' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iii) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が 5' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該 5' 末端の隣りの塩基 (5' 側) が 3' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iv) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が 5' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該 5' 末端の隣りの塩基 (5' 側) が 3' 末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および  
(d) 連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、

を含む方法。

【請求項 1 4】 請求項 8 に記載のロスマンドートムソン症候群の検査方法であって、

(a) 患者からタンパク質試料を調製する工程、

(b) RecQ4 ヘリカーゼに対する抗体を、調製したタンパク質試料に接触させる工程、

(c) 該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、  
を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ロスマンドートムソン症候群の原因遺伝子、該疾患の検査方法、および該疾患の検査薬および治療薬に関する。

【0 0 0 2】

## 【従来の技術】

ロスムンドートムソン症候群 (Rothmund-Thomson syndrome (RTS); 先天性多形皮膚萎縮症 (poikiloderma congenital)) は、稀な常染色体劣勢遺伝病であり、その病態生理や原因遺伝子は未だ解明されていない。1868年に、バイエルン地方の孤立した村で、若年で多形皮膚萎縮症を発症し、若年性白内障の高い発症率を示す10人の患者を、ドイツの眼科医、オーグスト・ロスムンド (August Rothmund) が初めて報告した (A. Rothmund, Arch. Ophthalmol. 4:159 (1887))。1936年になって、英国の眼科医シドニー・トムソン (Sidney Thomson) が多形皮膚萎縮症のよく似た3人の患者を報告した (M.S. Thomson, Br. J. Dermatol. 48:221 (1936))。そのうち2人は骨に異常を有していた。今日、これらの2つの重複する臨床事例はロスムンドートムソン症候群 (RTS) として知られている。この疾患は様々な人種の子供に関して世界的に報告されており、これまでに200を超えるロスムンドートムソン症候群の事例がベノスらにより報告されている (E. M. Vennos et al., J. Am. Acad. Dermatol. 27:750 (1992); E.M. Vennos and W.D. James, Dermatol. Clinics. 13:143 (1995))。ロスムンドートムソン症候群の臨床的な情報は豊富であるものの、診断に関しては臨床的な背景に頼らざるを得ず、実験室で行いうる確立した検査方法は見出されていない。

## 【0003】

ロスムンドートムソン症候群の臨床症状には、色素過剰および欠乏が混合した領域を伴う新生児期の皮膚の萎縮および毛細管拡張、若年の白髪化および脱毛、若年白内障、低身長、先天性骨格異常、並びに間充織腫瘍のリスクの増大が含まれる。細胞遺伝学的研究から、ロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞は遺伝的に不安定でしばしば染色体の組換えが起こり、後天的体細胞モザイク形成 (mosaicism) が生じることが示されている (K.L. Ying et al., J. Med. Genet. 27:258 (1990); V.M. Der Kaloustian et al., Am. J. Med. Genet. 37:336 (1990); K.H. Orstavik et al., J. Med. Genet. 31:570 (1994); M. Miozzo et al., Int. J. Cancer 77:504 (1998); N.M. Lindor et al., Clin. Genet. 49:124 (1996))。患者細胞の遺伝的不安定性、若年での不十分な身体発達、皮膚の異常、および腫瘍形成の高いリスクなどの、細胞遺伝学および臨床的所見のいく

つかは、ウェルナー症候群 (Werner syndrome) やブルーム症候群 (Bloom syndrome) の所見と類似している。

【0004】

ウェルナー症候群およびブルーム症候群の原因遺伝子 (それぞれWRNおよびBLM) は、共にRecQ DNAヘリカーゼファミリーに属し、DNAヘリカーゼをコードする大腸菌のRecQ遺伝子のホモログとして同定された (K. Nakayama et al., Mol. Gen. Genet. 200:266 (1985))。大腸菌のRecQ DNAヘリカーゼの真核生物のホモログとしては、他に出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のSGS1および分裂酵母 (*S. pombe*) のrqh1<sup>+</sup> が同定されており、酵母のSGS1およびrqh1<sup>+</sup> の変異は、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 細胞においては相同組換えや非相同組換えが高頻度で起こり、分裂酵母 (*S. pombe*) 細胞においてはS期において組換えが高頻度で起こることが知られている (S. Gangloff et al., Mol. Cell. Biol. 14:8391 (1994); P.M. Watt et al., Cell 81:253 (1995); E. Stewart et al., EMBO J. 16:2682 (1997))。

【0005】

ロスマンドートムソン症候群の原因遺伝子については、調べられた3人のロスマンドートムソン症候群患者のうち2人が第8染色体のトリゾミーのモザイクが起きていたことから、原因遺伝子は第8染色体にあると予想されている (N.M. Lindor et al., Clin. Genet. 49:124 (1996))。しかしながら、その原因遺伝子はこれまで同定されていなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ロスマンドートムソン症候群の原因遺伝子を解明することを課題とする。さらに該疾患の検査方法並びに該疾患の検査薬および治療薬を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、RecQヘリカーゼ遺伝子ファミリーに属するRecQ4ヘリカーゼ遺伝子をコードするcDNAをすでに単離している (特願平9-200387)。本発明者らは



、このRecQ4ヘリカーゼ遺伝子がロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子である可能性があると考え、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAを単離し、その配列情報を基に作成したプライマーを利用して、ロスムンドートムソン症候群患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の有無を調べた。その結果、試験した7人のロスムンドートムソン症候群患者中3人が、RecQ4遺伝子の変異をヘテロに複合して持つことを見出した。これらの患者のうち2人は兄弟であり、この2人のそれぞれの変異アレルは患者家系において遺伝したものであり、その患者由来の細胞にはRecQ4の転写の異常が特異的に見られたことから、RecQ4遺伝子の変異が遺伝的不安定をもたらし、ロスムンドートムソン症候群の原因となっていると考えられた。即ち、本発明者らは、RecQ4遺伝子がロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子であることを初めて実証することに成功した。

## 【0008】

さらに、この事実に基づき、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異を検出することによりロスムンドートムソン症候群の検査を行うことや、該変異を相補することにより該疾患の治療を行うことが可能であることを見出すに至った。

## 【0009】

本発明は、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子、該疾患の検査方法、並びに該疾患の検査薬および治療薬に関し、より具体的には、

- (1) RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA、
- (2) (1)に記載のゲノムDNAを含むベクター、
- (3) (2)に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (4) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスムンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNA、
- (5) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬、
- (6) RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする、ロスムンドートムソン症候群治療薬、
- (7) RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を有効成分とする、ロスムンドートム

ソン症候群検査薬、

( 8 ) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域の変異を検出することを特徴とする、ロスムンドートムソン症候群の検査方法、

( 9 ) ( 8 ) に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって、

( a ) 患者からDNA試料を調製する工程、

( b ) ( 4 ) に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、

( c ) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、

( 1 0 ) ( 8 ) に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって

( a ) 患者からRNA試料を調製する工程、

( b ) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、

( c ) ( 4 ) に記載のDNAをプローブとして用いて、分離したRNAに対しハイブリダイズさせる工程、

( d ) ハイブリダイズしたRNAを検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む方法、

( 1 1 ) ( 8 ) に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって

( a ) 患者からDNA試料を調製する工程、

( b ) ( 4 ) に記載のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

( c ) 増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、

( d ) 解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、

( e ) 分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む方法、

( 1 2 ) ( 8 ) に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって

( a ) 患者からDNA試料を調製する工程、

( b ) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域中におけるロ

スムンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 増幅したDNA断片を検出する工程、を含む方法、

(13) (8)に記載のロスムンドートムソン症候群を検査する方法であって

(a) 患者からDNA試料を調製する工程、

(b) ロスムンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製された一対の(4)に記載のDNAをプライマーとして用いて、患者由来のDNAを増幅する工程、

(c) 得られた増幅産物に対し、下記の(i)から(iv)のいずれかの一対のオリゴヌクレオチド；

(i) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(ii) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iii) 増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

(iv) 増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、

をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および

(d) 連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、を含む方法、

(14) (8)に記載のロスムンドートムソン症候群の検査方法であって、

(a) 患者からタンパク質試料を調製する工程、

(b) RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を、調製したタンパク質試料に接触させ

る工程、

(c) 該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、を含む方法、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明は、第一に、ロスマンドートムソン症候群(RTS)の原因遺伝子に関する。本発明者らにより、ロスマンドートムソン症候群の原因遺伝子がヒトRecQ4ヘリカーゼをコードすることが見出された。本発明者らにより決定されたRecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAの塩基配列を配列番号：1（発現調節領域）および配列番号：2（エキソンおよびイントロン領域）に示す。

【0011】

本発明のRecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAは、配列番号：1～3のいずれかに記載の塩基配列の一部または全部をプローブとして用いて、ハイブリダイゼーションによりゲノムDNAライブラリーをスクリーニングして得ることができるほか、配列番号：1または2に記載の塩基配列の一部をプライマーとして用いて、ゲノムDNAまたはゲノムDNAライブラリーを鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、単離することもできる。

【0012】

本発明のゲノムDNAは、後述するように、ロスマンドートムソン症候群の検査のためのプライマーやプローブの調製、ロスマンドートムソン症候群の遺伝子治療、RecQ4ヘリカーゼの製造などの目的に利用し得る。

【0013】

本発明は、また、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現制御領域に特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有する、ロスマンドートムソン症候群の検査に用いるためのDNAに関する。

【0014】

本発明において「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAまたはRNAとクロスハイブリダイゼーション

が有意に生じないことを指す。

【0015】

プライマーとして用いられる場合、オリゴヌクレオチドは、通常、15mer～35merであり、好ましくは20mer～28merである。

プライマーは、RecQ4ヘリカーゼのコード領域またはその発現を調節する領域の少なくとも一部を増幅しうるものであればいかなるものでもよい。このような領域としては、例えば、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、およびエンハンサー領域が含まれる。

【0016】

一方、プローブとしてのヌクレオチドは、合成オリゴヌクレオチドであれば、通常、少なくとも15塩基以上の鎖長を有する。プラスミドDNAなどのベクターに組み込んだクローンから得た二本鎖DNAをプローブとして用いたり、該クローンから転写によりRNAを合成してプローブとして用いることも可能である。プローブとして利用する領域としては、RecQ4ヘリカーゼのコード領域またはその発現を調節する領域の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするものであればいかなるものでもよい。プローブがハイブリダイズする領域としては、例えば、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のエキソン領域、イントロン領域、プロモーター領域、エンハンサー領域が含まれる。

【0017】

プローブとして用いる場合、オリゴヌクレオチド、二本鎖DNA、またはRNAは適宜標識して用いられる。標識する方法としては、例えばオリゴヌクレオチドの場合には末端標識法、二本鎖DNAの場合にはランダムプライマー法、PCR法、RNAの場合にはin vitro転写ラベル法が挙げられる。標識化合物としては末端標識法の場合には $[\gamma\text{-}^3\text{ }^2\text{P}]$  ATP、ランダムプライマー法、PCR法の場合には $[\alpha\text{-}^3\text{ }^2\text{P}]$  dCTPまたはジゴキシゲニン(digoxigenin/DIG)-dUTP、in vitro転写ラベル法の場合には $[\alpha\text{-}^3\text{ }^2\text{P}]$  CTPまたはDIG-UTPが挙げられる。

【0018】

本発明における「ロスマンドートムソン症候群の検査」は、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異を検出することを特徴とする。本発明において「ロスマンドートム

ソン症候群の検査」とは、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因してロスムンドートムソン症候群の症状を発現している患者の検査のみならず、被験者がRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因するロスムンドートムソン症候群にかかりやすいか否かを判断するために行う検査も含まれる。

また、本発明における「RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の検出」には、DNAレベルにおける検出、RNAレベルにおける検出の他、タンパク質レベルにおける検出が含まれる。

#### 【0019】

本発明の検査方法の一つの態様は、患者のRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列を直接決定する方法である。該方法は、(a) 患者からDNA試料を調製する工程、(b) 本発明のDNAをプライマーとして用いて患者由来のDNAを増幅し、塩基配列を決定する工程、および(c) 決定した塩基配列を健常者の対照と比較する工程、を含む。塩基配列の直接決定には、RecQ4ゲノムDNAの塩基配列を直接決定する場合と、RecQ4 cDNAの塩基配列を直接決定する場合とがある。

#### 【0020】

RecQ4ゲノムDNAの塩基配列を直接決定する場合は、患者からゲノムDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて患者のゲノムDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。RecQ4遺伝子の増幅におけるプライマーの長さは20mer～28merでT<sub>m</sub>値は65℃～75℃が好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4ゲノムDNAの長さは1 kb～1.5 kbであることが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4ゲノムDNA断片の5' および3' 末端の50 bp～100 bpが他の断片と重なり、RecQ4ゲノムDNAの全領域およそ6.5 kbをカバーするように設定することが好ましい。さらに、RecQ4遺伝子の発現調節領域を増幅し、検査の対象にしてもよい。増幅された断片の塩基配列決定は、例えば、Hattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行うことができる。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行い、この際増幅されたRecQ4ゲノムDNA断片に特異的なプライマーを用いる。次いで、Applied Bi

osystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータの解析を行う。変異の判定は、例えばDNASISのような塩基配列編集ソフトで配列を解析することにより行うことができる。即ち、コンピュータ上で正常なRecQ4ゲノムDNA配列と患者のRecQ4ゲノムDNA配列を比較することにより、変異を検出することができる。

#### 【 0 0 2 1 】

RecQ4 cDNAの塩基配列を直接決定する場合は、患者から調製したRNA試料から逆転写によりcDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて患者のcDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。RecQ4遺伝子の増幅におけるプライマーの長さは20mer～28merでTm値は65℃～75℃が好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4 cDNAの長さは1 kb～1.5 kbが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4 cDNA断片の5' および3' 末端の50 bp～100 bpが他の断片と重なり、RecQ4 cDNAの全領域およそ4 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅された断片の塩基配列決定は、上記ゲノムDNAの場合と同様に、例えば、Hattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行うことができる。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行い、この際増幅されたRecQ4 cDNA断片に特異的なプライマーを用いる。次いで、Applied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータの解析を行う。変異の判定は、例えばDNASISのような塩基配列編集ソフトで配列を解析することにより行うことができる。即ち、コンピュータ上で正常なRecQ4 cDNA配列と患者のRecQ4 cDNA配列を比較することにより、変異を検出することができる。

#### 【 0 0 2 2 】

本発明の検査方法としては、このように直接患者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外にも種々の方法を用いることができる。その一つの態様は、(a)患者からDNA試料を調製する工程、(b)本発明のDNAをプライマーとして用いて患者

由来のDNAを増幅する工程、(c)増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程、(d)解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程、および(e)分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を健常者の対照と比較する工程、を含む。

## 【 0 0 2 3 】

このような方法として、PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型) 法が挙げられる。PCR-SSCP法とは、同じ長さで塩基配列の異なる一本鎖DNAは分子内相互作用によって異なる高次構造をとるが故に、電気泳動上違った移動度を示すという原理に基づいている。即ち、変異をもつ一本鎖DNAは変異をもたない一本鎖DNAとは異なる高次構造とり、非変性ゲルで分離した場合に違った移動度を示し、したがって変異を検出することができる (Orita et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1989, vol.86, pp2766-pp2770 )。

## 【 0 0 2 4 】

PCR-SSCP法によりRecQ4ゲノムDNAあるいはRecQ4 cDNA中の配列変化を検出することができる。RecQ4ゲノムDNAから変異を検出する場合は、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて健常者および患者のゲノムDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。この際プライマーは予め末端標識法により<sup>32</sup>Pでラジオアイソトープ標識しておく。プライマーの長さは20mer~28merでTm値は65℃~75℃が好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4ゲノムDNAの長さは300 bp以内とするのが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4ゲノムDNA断片の5' および3' 末端の60 bp~100 bpが他の断片と重なり、RecQ4ゲノムDNAの全領域およそ6.5 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅されたDNA断片を、厚さ0.3 mm~0.35 mm、長さ40 cmの5%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。ゲルをオートラジオグラフで解析し、患者のバンドの移動度を健常者のバンドの移動度と比較して変異を検出する。

## 【 0 0 2 5 】

RecQ4 cDNAから変異を検出する場合は、患者から調製したRNA試料から逆転写によりcDNAを調製し、RecQ4遺伝子特異的なセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いて健常者および患者のcDNAからRecQ4遺伝子を増幅する。この際



プライマーは予め末端標識法により  $^{32}\text{P}$  でラジオアイソトープ標識しておく。プライマーの長さは20mer～28merで $T_m$ 値は65℃～75℃が好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーによって増幅されるRecQ4 cDNAの長さは300 bp以内とするのが好ましい。またセンスプライマーとアンチセンスプライマーは、増幅されるRecQ4 cDNA断片の5' および3' 末端の60 bp～100 bpが他の断片と重なり、RecQ4 cDNAの全領域およそ4 kbをカバーするように設定することが好ましい。増幅されたDNA断片を、厚さ0.3 mm～0.35 mm、長さ40 cmの5%非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。ゲルをオートラジオグラフで解析し、患者のバンドの移動度を健常者のバンドの移動度と比較して変異を検出する。

#### 【0026】

以上は検査方法の具体的な一例であり、詳細な手順は、当業者であれば適宜変更することができる。ゲノムDNAの検査においては、発現調節領域(プロモーター領域やエンハンサー領域)の変異を検査することも考えられる。また、ゲノムDNAやcDNAの特定の領域に変異を有するか否かを検査するには、RecQ4遺伝子の全領域をカバーするDNAを調製せず、検査部位を含むDNA断片だけを調製して検査に用いることもできる。

#### 【0027】

また、患者から調製したDNAの代わりにRNAを用いても同様に検出することが可能である。このような方法は、(a) 患者からRNA試料を調製する工程、(b) 大きさに応じて調製したRNAを分離する工程、(c) 検出可能な標識をした本発明のDNAをプローブとして用いて、分離したRNAに対しハイブリダイズさせる工程、および(d) ハイブリダイズしたRNAを検出し、健常者の対照と比較する工程、を含む。具体的な方法の一例としては、患者から調製したRNAを電気泳動し、本発明のプローブDNAを用いてノーザンブロッティングを行い、シグナルの有無、強弱、および/またはゲル上での移動度の差を検出する。

#### 【0028】

これらの方法以外にも、予め選択された特定の位置の変異を検出することにより本発明の検査を行うこともできる。

#### 【0029】

このような検査方法の1つの態様は、(a) 患者からDNA試料を調製する工程、(b) RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域中におけるロスマンドートムソン症候群に特異的な変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの少なくとも一つとして用いて患者由来のDNAを増幅する工程、および(c) 増幅したDNA断片を検出する工程、を含む方法である。

## 【0030】

このような方法としては、例えばMASA (mutant-allele-specific amplification) 法が挙げられる(松本ら、実験医学 15:2211-2217 (1977); 特開平10-201498号公報)。

MASA法とは、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むオリゴヌクレオチドをプライマーの一つとして、ポリメラーゼ連鎖反応により鋳型ゲノムDNAまたはcDNAを増幅し、次いで、ゲル電気泳動を行うことにより、変異アレルを検出する方法である。

## 【0031】

本発明において、この方法を実施する場合には、鋳型DNAを増幅するために、一組のプライマー(5'側センスプライマー及び3'側アンチセンスプライマー)を合成する。ここで、5'側センスプライマーは、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むものを合成する。5'側センスプライマーは、変異を有するRecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域を鋳型とした場合に特異的にプライマーとして機能し得るが、該変異を有さないRecQ4ヘリカーゼをコードするDNAまたはその発現調節領域を鋳型とした場合はプライマーとして機能しないように設計する。この場合、5'側センスプライマーとしては、変異塩基と塩基対を形成する塩基がプライマーの3'末端となるようにすることが好ましい。一方、3'側アンチセンスプライマーとしては、変異を含まない領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。ポリメラーゼ連鎖反応は、変異を有するDNA断片(異常アレル)が鋳型となった場合には5'側センスプライマーがハイブリダイズすることにより効率良く増幅されるような条件であり、かつ、変異のないDNA断片(正常アレル)が鋳型となった場合には5'側センスプライマーが完全にハイ

ブリダイズすることができずに増幅効率が非常に悪くなるような条件で行う。

例えば、95℃で5分間の加熱を1回行った後、94℃で30秒間の加熱、50℃で30秒間の加熱、及び72℃で30秒間の加熱を1サイクルとしてこれを40サイクル行い、その後さらに、72℃で4分間の加熱を1回行う。

#### 【0032】

また、逆に、3'側アンチセンスプライマーとして、変異塩基と塩基対を形成する塩基を含むものを用い、5'側センスプライマーとして、変異を含まない領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いて、同様にポリメラーゼ連鎖反応を行ってもよい。

#### 【0033】

その結果、変異を有する検体DNAは、変異を有するプライマーとハイブリダイズすることができるため増幅が効率よく行われ、例えば電気泳動を行った場合に、ゲル上に陽性バンドとして検出される。これに対し、正常の検体DNAは、変異を有するプライマーと完全にハイブリダイズすることができないため増幅が行われず、ゲル上にバンドは現れない。

#### 【0034】

また、上記変異を有するプライマーでの検出に加えて、該プライマーに対応する変異を有しないプライマー（変異塩基と塩基対を形成せず、正常塩基と塩基対を形成する塩基を含む）での検出を行うことにより、被験者が変異をホモに有するかヘテロに有するかを判定することも可能である。即ち、変異を有するプライマーでの検出によってバンドが検出され、変異を有しないプライマーでの検出によってバンドが検出されなかった場合に、検体DNAはロスムンドートムソン症候群に関与するホモ変異を起こしているものと判定することができる。また、いずれの場合でもバンドが検出された場合には、検体DNAはヘテロ変異を起こしていると判定され、変異を有しないプライマーでの検出のみにバンドが検出されれば、検査部位に関し正常であると判定される。

#### 【0035】

本発明の検査方法の他の態様は、（a）患者からDNA試料を調製する工程、（b）ロスムンドートムソン症候群に特異的な変異塩基を挟み込むように調製され

た一対のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、患者由来のDNAを増幅する工程、(c)得られた増幅産物に対し、下記の(i)から(iv)のいずれかの一対のオリゴヌクレオチド[(i)増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(ii)増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が3'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該3'末端の隣りの塩基(3'側)が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(iii)増幅産物中の変異塩基と塩基対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'端となるように合成したオリゴヌクレオチド、(iv)増幅産物中の変異塩基に対応する健常者における塩基と対を形成する塩基が5'末端となるように合成したオリゴヌクレオチドおよび該5'末端の隣りの塩基(5'側)が3'端となるように合成したオリゴヌクレオチド]をハイブリダイズさせ、これらオリゴヌクレオチドを連結する工程、および(d)連結したオリゴヌクレオチドを検出する工程、を含む。

## 【0036】

このような検出方法としては、例えば、OLA (Oligonucleotide Ligation Assay) 法が挙げられる(松本ら、実験医学 15:2211-2217 (1977); 特開平10-201498号公報)。まず、各検出対象部位(変異が予想される部位)から上流及び下流に適切な間隔をおいてプライマーを設計し、ポリメラーゼ連鎖反応を行うことにより、検出対象部位を含むゲノムDNA断片またはcDNA断片を増幅する。各検出対象部位からプライマーまでの距離は任意に設定することができるが、好ましくは、100～200bpとなるように設定する。また、プライマーのヌクレオチド数については特に限定されないが、20～30塩基のものが好ましい。

## 【0037】

一方、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列をもとに、前記検出対象部位が3'末端となるように18～30個の長さのオリゴヌクレオチドを合成し、かつ、その3'末端に、予想される変異塩基と塩基対を形成する塩基を導入する(これにより合成されたオリゴヌクレオチドを「オリゴヌクレオチドA」と称する)。また、前記

検出対象部位の隣の塩基（3' 側）が5' 末端となるように18～30個のオリゴヌクレオチドを合成する（これにより合成されたオリゴヌクレオチドを「オリゴヌクレオチドX」と称する）。なお、変異プライマーは、正常な配列に対し公知の手法により（例えば、点突然変異誘発キット（In vitro Mutagenesisキット，宝酒造社製）を用いて）変異を導入して調製してもよく、また、変異導入後の配列を設計して化学合成してもよい。

#### 【0038】

この際、後述するリガーゼ反応により連結したオリゴヌクレオチドの精製及び検出を容易にするために、例えば、オリゴヌクレオチドAの5' 末端は、ビオチンなどで標識しておき、オリゴヌクレオチドXの3' 末端はジゴキシゲニン-11-ダイデオキシUTPなどで標識し、5' 末端はリン酸基を付加しておく为好ましい。

#### 【0039】

次に、前記ポリメラーゼ連鎖反応反応産物に、前記オリゴヌクレオチドA及びXをアニーリングさせ、オリゴヌクレオチドAとXとを連結させる。検体のDNAに目的とする突然変異が存在する場合は、オリゴヌクレオチドAの3' 端が変異塩基と塩基対を形成することができるため、オリゴヌクレオチドAとXとが連結でき、その両端にそれぞれ標識（例えば、ビオチン及びジゴキシゲニン）を持つものが作られる。

#### 【0040】

例えば、両端にビオチン及びジゴキシゲニンを有する産物であれば、これをストレプトアビジンでコートしたプレートに吸着させた後、アルカリフォスファターゼなどで標識した抗ジゴキシゲニン抗体を反応させることによって、呈色反応が生じて突然変異を検出することができる。

#### 【0041】

これに対し、検体のDNAに突然変異が存在しない場合は、オリゴヌクレオチドAの3' 末端が鋳型DNAの対応する塩基と塩基対を形成することができないため、オリゴヌクレオチドAとXとが連結することができない。

従って、例えば、オリゴヌクレオチドAとXとをそれぞれビオチン及びジゴキシゲニンで標識した場合でも、両標識を両端に有するオリゴヌクレオチドが形成

されず、その結果、連結反応産物をアビジンでコートしたプレートに結合させ、これにアルカリフォスファターゼなどで標識した抗ジゴキシゲニン抗体を作用させても呈色反応は検出されない (Delahunty et al., Am. J. Hum. Genet. 58: 1239-1246, 1996)。

#### 【0042】

また、以下のように検出対象部位に変異を有さないDNAを特異的に検出するオリゴヌクレオチドを用いれば、被験者が変異をホモに有するか否かを判定することができる。具体的には、オリゴヌクレオチドAとオリゴヌクレオチドXとの結合実験と並行して、前記検出対象部位が変異していない正常な配列を有するオリゴヌクレオチド（オリゴヌクレオチドBとする）をオリゴヌクレオチドAと同様に合成し、オリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験を行う。

#### 【0043】

その結果、オリゴヌクレオチドAとXとの結合実験によって呈色反応が生じ、オリゴヌクレオチドBとXとの結合実験によって呈色反応が生じなかった場合に、検体DNAはロスマンドートムソン症候群に関与するホモ変異を起こしているものと判定することができる。なお、オリゴヌクレオチドAとオリゴヌクレオチドXとの結合実験及びオリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験のいずれの場合でも呈色反応が生じた場合はヘテロ変異であると判定され、オリゴヌクレオチドBとオリゴヌクレオチドXとの結合実験にのみ呈色反応が生じた場合は、検査部位に関し正常であると判定される。

#### 【0044】

また、その5'末端に予想される変異塩基と塩基対を形成する塩基を導入されたオリゴヌクレオチドと、前記検出対象部位の隣の塩基（5'側）が3'末端となるように調製したオリゴヌクレオチドとの組み合わせを用いることによって、上記オリゴヌクレオチドAとXの場合と同様に検出することが可能である。

#### 【0045】

本発明の検出方法は、RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を用いて行うことも可能である。その1つの態様は、（a）患者からタンパク質試料を調製する工程、（b）調製したタンパク質試料に、RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を接触させる

工程、および(c)該抗体に結合するタンパク質を検出する工程、を含む。

【0046】

本発明の検査に用いられる抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である(例えば特願平9-200387号参照)。抗体を作成するために用いる抗原は、例えば、抗原をコードする遺伝子を適当なプラスミドベクターに組み込んで、大腸菌で遺伝子産物を発現させる、あるいはバキュロウイルスベクターに組み込んで、昆虫細胞で遺伝子産物を発現させることにより得ることもできる。また、合成ペプチドを使用してもよい。発現ベクターとしては、大腸菌で発現させる場合は、例えばpQE30(Qiagen社製)のようなベクターが、また、バキュロウイルスベクターにはpAclLT-B(PharMingen社製)のようなベクターも使用できる。この場合、遺伝子産物にFlag(Chiang, C. et al., EMBO J., 12: 2749-2762 (1993))や6×his(Immunol. Meth. 4: 121-152 (1990))のようなタグをつけておき、精製を容易にすることができる。発現させた遺伝子産物は、タグを利用して精製することができる。

【0047】

ロスムンドートムソン症候群患者においては、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異によりフレームシフトや終止コドンが生じ、正常なRecQ4ヘリカーゼが持つC末端が欠失したタンパク質が生じると予想させる事例が複数見出された(実施例参照)。従って、RecQ4ヘリカーゼのC末端部分を認識する抗体を用いれば、ロスムンドートムソン症候群を簡便かつ効率的に検査することができる(特願平10-311284号参照のこと)。

【0048】

また、本発明の抗体検査において、RecQ4ヘリカーゼのC末端領域を認識する抗体に加え、N末端領域を認識する別の抗体を組み合わせ用いれば、患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因する疾患が原因遺伝子の発現異常によるものか構造異常によるものかを検査することができる。即ち、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異に起因する疾患における原因遺伝子の途中に変異が生じると、フレームシフトや終止コドンの出現により正常なC末端が欠損した翻訳産物が産生

され、N末端領域は正常であるが、C末端領域では変異が生じ易いと考えられる。このため原因遺伝子の翻訳産物の構造異常が起こった場合、N末端領域に対する抗体では翻訳産物が検出されるが、C末端領域に対する抗体ではそれが検出されない可能性が高い。

## 【0049】

さらに、例えばWRNヘリカーゼ遺伝子においては、変異の入ったmRNAの発現が非常に低下していることも知られており（Yamabe, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 236: 151-154 (1997)）、実際、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子においても、RTS患者において有意にmRNAレベルが低下していた（実施例参照）。そのような場合は変異したRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の翻訳産物自体が検出されないことも想定される。このようなRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現異常（発現の著しい低下）の場合には、いずれの抗体でも免疫反応は検出されないと考えられる。従って、これら両抗体を組み合わせることでロスモンドートムソン症候群の原因の検査を行うことができる。

## 【0050】

RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体を用いる本発明の検査は、公知の種々の免疫学的手法により行うことができる。好ましい方法としては、ウェスタンブロットが挙げられる。具体的には、患者細胞を、界面活性剤を含む緩衝液でリシスさせた後に、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ゲルからフィルターにタンパク質を転写した後、RecQ4ヘリカーゼに結合する抗体でフィルター上の目的のタンパク質を検出することができる。また、エライザ法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA; I. Roitt et al., In "Immunology", The C.V. Mosby Co., 1989, pp25.5-25.6) や、組織切片の免疫化学染色法を用いてRecQ4ヘリカーゼの検出を行うこともできる。抗体の標識としては、例えばアルカリフォスファターゼあるいはホースラディッシュペーパーオキシダーゼ等の酵素標識を用いることができ、この場合には呈色反応で目的のタンパク質を検出することができる。また、蛍光標識を用いることもできる。目的のタンパク質の検出においては、標識を目的のタンパク質に対する抗体を認識する2次抗体に結合して用いることもでき、また、目的のタン



パク質に対する抗体に結合して用いることもできる。上記のような方法を用いて、RecQ4ヘリカーゼの欠損、蓄積、または細胞内分布の異常の検査を行うことができる。

#### 【0051】

このようにRecQ4ヘリカーゼに結合する抗体はロスムンドートムソン症候群の検査に用いることが可能であるが、検査薬として用いる場合、通常、pH6～8程度の緩衝液（例えばリン酸緩衝液、HEPES緩衝液、またはTris緩衝液）を用い、担体（例えば1～5%程度の牛血清アルブミンまたは0.2%程度のゼラチンなど）、防腐剤（例えば0.1%のアジ化ナトリウム）等を必要に応じて混合してもよい。

#### 【0052】

本発明のこれらの検査において用いられる患者試料としては、ゲノムDNAにおける検査であればゲノムDNAを含む患者由来の任意の細胞を使用することが可能であり、またRNA、cDNA、またはタンパク質における検査であれば、健常者でRecQ4ヘリカーゼ遺伝子が発現されている細胞に対応する患者由来の細胞であれば、原理的にはどのような細胞でも使用できる。例えばバイオプシーにより得られる皮膚組織切片から確立された繊維芽細胞や、採血により得られる白血球中のB-リンパ球をEpstein-Barrウイルスによってトランスフォームした細胞などを用いることができる。

#### 【0053】

また、本発明はロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する。その一つの態様は、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを有効成分とする。RecQ4ヘリカーゼをコードするDNAを治療薬として用いる場合、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNAの全長若しくは一部、またはRecQ4ヘリカーゼ cDNA（ヒトRecQ4ヘリカーゼをコードするcDNAを配列番号：3に示す）の全長若しくは一部をアデノウイルス及びレトロウイルス等の適当なベクターに組み込み、静脈内投与、患部への局所投与等の方法により患者に投与する。投与方法としては、インビボ法その他、エキスビボ法を用いることも可能である。

これにより患者体内における変異したRecQ4ヘリカーゼ遺伝子を正常な遺伝子に置換したり、また、正常な遺伝子を付加的に患者に投与することが可能であり

、その結果、ロスムンドートムソン症候群の治療を行うことができる。

【0054】

ロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する他の態様は、RecQ4ヘリカーゼを有効成分とする。RecQ4ヘリカーゼは、天然のタンパク質として、また遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。ヒトRecQ4ヘリカーゼのアミノ酸配列を配列番号：4に示す。天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、RecQ4ヘリカーゼに対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行うことにより、RecQ4ヘリカーゼ発現の高い組織や細胞（例えば、胸腺や精巣、chronic myelogenous leukemia K562細胞、promyelocytic leukemia HL-60細胞、HeLa細胞）から単離することが可能である。一方、組換えタンパク質は、例えば、RecQ4ヘリカーゼをコードするDNA（例えば、配列番号：3）で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および大腸菌（*E. coli*）が挙げられる。用いられる発現ベクター、宿主細胞へのベクターの導入、および得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、公知の方法を用いて行うことができる。得られたRecQ4ヘリカーゼをロスムンドートムソン症候群の治療薬として用いる場合には、RecQ4ヘリカーゼを直接投与することもできるが、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することもできる。例えば、薬剤として一般的に用いられる媒体、例えばPBSの様な中性の溶液に溶かして投与しうる。投与量は、患者の体重、年齢、健康度、あるいは投与方法などの諸要因に応じて変動するが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。投与は、例えば、皮下投与、経口投与、患部への直接投与などの方法で行うことができる。

【0055】

ロスムンドートムソン症候群の治療薬に関する他の態様は、RecQ4ヘリカーゼの発現を促進・上昇させる化合物を有効成分とする。

ロスムンドートムソン症候群の発症には、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現の低下が密接に関与している場合も考えられる。従って、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させることにより、ロスムンドートムソン症候群の治療を行う

ことも考えられる。

【0056】

RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる化合物のスクリーニングは、RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現調節領域（プロモーター領域やエンハンサー領域）をルシフェラーゼ・レポーターベクターに組み込み、培養細胞に導入して、導入細胞中でルシフェラーゼ活性を促進・上昇させる化合物としてスクリーニングできる。ヒトRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現調節領域の塩基配列を配列番号：1に示す。レポーター遺伝子としてはホタルルシフェラーゼ遺伝子やウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が挙げられる。またこれらのレポーター遺伝子をもつベクターとしては、ホタルルシフェラーゼレポーターベクターpGL3や、ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクターpRL（Promega社製）が挙げられる。導入細胞としてはヒト293細胞、HeLa細胞、K562細胞やサルCOS7細胞が挙げられる。細胞への導入方法としてはリン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、電気パルス法等の公知の方法を用いて行うことができる。本発明においてこの方法を実施する場合にはヒトRecQ4ヘリカーゼ遺伝子のプロモーター領域を組み込んだレポーター遺伝子を上述の方法によりヒトあるいはサルの培養細胞に導入し培養する。培養中に種々の被検試料を培養液中に添加し、48時間後に細胞抽出液を調製し、文献（Yamabe et al., Mol. Cell. Biol., 1998, vol. 18, pp6191-pp6200.）に記載の方法で細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を検出する。以上の操作によりRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる化合物が同定される。スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0057】

RecQ4ヘリカーゼ遺伝子の発現を促進・上昇させる物質を疾患の治療薬として用いる場合には、上記RecQ4ヘリカーゼを治療薬として用いる場合と同様に、公知の製剤学的製造法により製剤化して投与することができる。

【0058】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0059】

【実施例1】 RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のゲノムDNAのクローニング

ヒトRecQ4遺伝子のゲノムDNAはP1/PACライブラリーのスクリーニングによって得られた。P1/PACライブラリーは[Smoller, et al., Chromosoma, 1991, vol. 100, pp487-pp494.]に作製法が記載されており、Genome Systems社製のものを用いた。スクリーニングはRecQ4遺伝子の第21エキソンの塩基配列に相当するセンスプライマー-Q4P (5'-CGC TTC TGG AGA AAA TAC CTG CAC-3' /配列番号: 9) およびアンチセンスプライマー-Q4Q (5'-TTG GAG CCT CCT CGT TCC CAC ACC-3' /配列番号: 10)を用いてPCRにより行った。またスクリーニングはGenome Systems社によって行われた。スクリーニングによって得られたP1クローン#13447からのDNAの単離・精製は[Smoller, et al., Chromosoma, 1991, vol. 100, pp487-pp494.]に記載の方法により行った。精製したP1 DNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子のゲノム塩基配列を決定した。決定された、RecQ4ヘリカーゼをコードするゲノムDNA (第1エキソンから第21エキソンまで)の塩基配列を配列番号: 2に示す。塩基配列決定法はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行った。そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー (モデル ABI 373) で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピューターによりデータを解析した。塩基配列決定に用いたRecQ4遺伝子特異的プライマーは表1の通りであった。

【0060】

【表1】

---

Q4 137s (5'-GTT TCC TGA ACG AGC AGT TCG ATC-3' /配列番号: 11)

Q4 714s (5'-GCT GCC TCC AGT TGC TTT TGC CTG-3' /配列番号: 12)

Q4 A2 (5'-TTG GTC GCA GCC CGA TTC AGA TGG-3' /配列番号: 13)

- Q4 A3 (5' -TGG CCC GTG GTA CGC TTC AGA GTG-3' /配列番号 : 14)  
 Q4 A5 (5' -GAC GGC TGC GCG GGA GAT TCG CTG-3' /配列番号 : 15)  
 Q4 A9 (5' -CTC AGC CCC TCC AGT CAA GCT AGG-3' /配列番号 : 16)  
 Q4 C5 (5' -ACC AGT GCC TCA GGT GTC AGC-3' /配列番号 : 17)  
 Q4 C8 (5' -GGA AAT GTG CTG GGA AAG GAG-3' /配列番号 : 18)  
 Q4 D5 (5' -ACC AAG AGT CCA CAG CCT ACG-3' /配列番号 : 19)  
 Q4 D7 (5' -GCT CCG TGG AGT TTG ACA TGG-3' /配列番号 : 20)  
 Q4 D9 (5' -AGC GCA GCA CCA GGC TCA AGG-3' /配列番号 : 21)  
 Q4 D13 (5' -GCA CTG CTT CCT GGG CCT CAC AGC-3' /配列番号 : 22)  
 Q4 E (5' -GGG TAC AGC GAG CCT TCA TGC AGG-3' /配列番号 : 23)  
 Q4 E128 (5' -CTC GAT TCC ATT ATC ATT TAC TGC-3' /配列番号 : 24)  
 Q4 F (5' -CTG GGC AGG AGC GTG CAG TCA TGC-3' /配列番号 : 25)  
 Q4 G (5' -AGG GGA GAG ACG ACC AAC GTG AGG-3' /配列番号 : 26)  
 Q4 H1 (5' -TTA GGA TCC GGG GTG CTT GTG GAG TTC AGT G-3' /配列番号 : 27)  
 Q4 H2 (5' -TTA GGA TCC CAG CTT ACC GTA CAG GCT TTG G-3' /配列番号 : 28)  
 Q4 K (5' -TCC TGG CTG TGA AGA GGC TGG TAC-3' /配列番号 : 29)  
 Q4 L (5' -ATC CCC CAA TGC AGT GCA GTC AGC-3' /配列番号 : 30)  
 Q4 U (5' -AAT CTG GGA CCT CAC TGT GAC ATC-3' /配列番号 : 31)  
 Q4 Z (5' -AGG GTG CCT TTC AGA TTG GCC TTG-3' /配列番号 : 32)

# 【 0 0 6 1 】

塩基配列を解析した結果、RecQ4遺伝子は 2 1 個のエキソンと 2 0 個のイントロンで構成され、その全長はおよそ 6.5 kbであることが判明した。

# 【 0 0 6 2 】

【実施例 2】 RecQ4ヘリカーゼ遺伝子のプロモーター領域のクローニング

ヒトRecQ4遺伝子のゲノムDNAを含むP1クローン#13447のDNAは制限酵素BamHIとBglIII（宝酒造社製）で消化し、またプラスミドベクターpBluescriptII KS+はBamHIで消化した。これらを混合しT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を加えてライゲーション反応させた。反応物を用いて大腸菌コンピテントセルDH5α（東洋紡績

社製)を形質転換し、得られた大腸菌コロニーがヒトRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域をもつかどうかをPCRによりスクリーニングした。5'上流領域を含むクローンのスクリーニングには、RecQ4ゲノムDNA配列の残基1399～残基1645の247bpを増幅するセンスプライマー-Q4 S (5'-TCA CAA CTT CTG ATC CCT GGT GAG-3' /配列番号: 5)、およびアンチセンスプライマー-Q4 R (5'-GAG GGT CTT CCT CAA CTG CT A CAG-3' /配列番号: 6)を用いた。PCR反応溶液に、爪楊枝で採取したコロニーを加え、PCRは95℃ 5分の変性の後、94℃ 30秒(変性)、55℃ 30秒(アニーリング)、72℃ 30秒(伸長)の反応を35サイクル行い、最後に72℃ 5分反応させた。反応が終了したPCR反応溶液を2%アガロースゲルで電気泳動し、247bpのバンドが検出されたコロニーを陽性とした。得られた陽性コロニーを3 mlのLB培地で培養し、アルカリ-SDS法によりプラスミドDNAを調製した。そしてこのプラスミドDNAを鋳型にし、プライマー-Q4 A14 (5'-CAA TGG GAG GCG TCA ACG TCA TCG-3' /配列番号: 7)およびQ4 A15 (5'-GAG GCG AAA GAG CGG AGG GTC CAG-3' /配列番号: 8)を用いてRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域の塩基配列を決定した。RecQ4遺伝子の転写開始点はキャップサイトPCR法によりすでに決定されている(Kitao, S. et al., Genomics, 1998, vol. 54, pp443-pp452、特願平9-200387号)。キャップサイトPCR法は転写開始塩基を正確に決定する方法であり、ヒトWRN遺伝子の転写開始点もこの方法で決定された[Yamabe et al., Mol. Cell. Biol., 1998, vol. 18, pp6191-pp6200.]。決定された転写開始点はRecQ4ゲノムDNA塩基配列およびRecQ4 cDNA塩基配列の残基1に相当し、得られたRecQ4ゲノムDNAの5'上流領域の塩基配列を解析した結果、転写開始塩基から5'上流679 bp(配列番号: 1)を明らかにした。

### 【0063】

【実施例3】 ロスムンドートムソン症候群患者におけるRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異の検出

本発明者らは以前、RecQヘリカーゼファミリー遺伝子に属する2つの新規なヒトヘリカーゼ遺伝子RecQ4およびRecQ5をクローニングし、解析を行った(特願平9-200387号、特願平10-81492、およびKitao, S. et al., Genomics, 1998, vol. 54, pp443-pp452.参照)。これら2つの新規遺伝子に加わり、ヒトRecQヘリカ

ーゼ遺伝子ファミリーのメンバーは、RecQ1 (M. Seki et al., *Nucleic Acids Res.* 22:4566 (1994); K.L. Puranam et al., *J. Biol. Chem.* 269:29838 (1994))、BLM (N.A. Ellis et al., *Cell* 83:655 (1995))、WRN (C.-E. Yu et al., *Science* 272:258 (1996))、RecQ4およびRecQ5の5つになった。

#### 【0064】

これら5つのRecQヘリカーゼ遺伝子のノーザンブロット解析を行ったところ、RecQ5はRecQ1と同様に調べた全ての組織や器官でユビキタスな発現が観察されたのに対し、RecQ4は胸腺や精巣で発現が著しく高く、脾臓、小腸そして大腸でも高い発現が観察され、BLMとWRNに似た組織特異的な発現が認められた。BLMとWRNはそれぞれブルーム症候群およびウエルナー症候群の原因遺伝子であることから、RecQ4遺伝子が何らかの疾患に関わっていると考え、ブルーム症候群およびウエルナー症候群に似た病状を示し、未だ原因遺伝子が同定されていないロスムンドートムソン症候群に注目した。そこで、リンダーらにより報告され、これまでにロスムンドートムソン症候群患者と分類されている2人の患者(兄弟)であるII.3およびII.6由来の細胞およびDNA、そしてこれらの両親由来の細胞およびDNA (N.M. Lindor et al., *Clin. Genet.* 49:124 (1996))、並びに上記ロスムンドートムソン症候群患者とは無関係な他のロスムンドートムソン症候群患者由来の細胞およびDNAを用いて、RecQ4遺伝子の変異を解析した。

#### 【0065】

具体的には、まず、Lindorらによって報告されている2人のRTS患者、II.3、I.6およびこれらの両親について、RecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームと、RecQ4遺伝子の全てのエキソン領域をPCRにより増幅し、塩基配列の決定・比較を行った。

#### 【0066】

RecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームを増幅するため、2人のRTS患者の線維芽細胞株からAGPC法 [Chomczynski et al., *Analytical Biochemistry*, 1987, vol.162, pp.156-159] によりtotal RNAを抽出し、Oligo(dT)30セルロースビーズを用いてmRNAを調製し、続いて逆転写(RT)反応を行いcDNAを調製した。RecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームは以下(表2)のPCR反応を行っ

て増幅した。

【0067】

【表2】

---

1 次反応液組成：鋳型cDNA	1 $\mu$ l
20 $\mu$ M 各プライマー (A5/A7)	0.5 $\mu$ l $\times$ 2
10 $\times$ バッファー (Klontech社製)	2.5 $\mu$ l
2.5mM dNTPs	2 $\mu$ l
DMSO	1.25 $\mu$ l
Klen Taq. polymerase (Klontech社製)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	16.75 $\mu$ l
(total volume 25 $\mu$ l)	

---

2 次反応液組成：1 次反応液	0.1 $\mu$ l
20 $\mu$ M 各プライマー (A6/A8)	0.5 $\mu$ l $\times$ 2
10 $\times$ バッファー (Klontech社製)	2.5 $\mu$ l
2.5mM dNTPs	2 $\mu$ l
DMSO	1.25 $\mu$ l
Klen Taq. polymerase (Klontech社製)	0.5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	17.65 $\mu$ l
(total volume 25 $\mu$ l)	

---

反応条件：1 $\times$  (94 $^{\circ}$ C 1 min)  
5 $\times$  (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 4 min)  
5 $\times$  (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 70 $^{\circ}$ C 4 min)  
25 $\times$  (94 $^{\circ}$ C 30 sec, 68 $^{\circ}$ C 4 min)  
1 $\times$  (4 $^{\circ}$ C  $\infty$ )

---

プライマー配列



A5 5'-GAC GGC TGC GCG GGA GAT TCG CTG-3' /配列番号 : 15

A6 5'-AGA TTC GCT GGA CGA TCG CAA GCG-3' /配列番号 : 33

A7 5'-CAG GTT TTG CCC AGG TCC TCA GTC-3' /配列番号 : 34

A8 5'-GTC ACT GCC CTA GCC TCT GAC AAC-3' /配列番号 : 35

### 【 0 0 6 8 】

PCR産物はアガロースゲルから切り出して精製し、pCR2.1ベクター (Invitrogen社製) にサブクローニングした。塩基配列決定はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISMシーケンシングキットを使って反応を行った。塩基配列決定に用いたプライマーは以下(表3) の通り。

### 【 0 0 6 9 】

【表3】

Q4 A2	(5'-TTG GTC GCA GCC CGA TTC AGA TGG-3' /配列番号 : 13)
Q4 U	(5'-AAT CTG GGA CCT CAC TGT GAC ATC-3' /配列番号 : 31)
Q4 T	(5'-TCA TCT AAG GCA TCC ACC CCA AAG-3' /配列番号 : 36)
Q4 S	(5'-TCA CAA CTT CTG ATC CCT GGT GAG-3' /配列番号 : 5)
Q4 A9	(5'-CTC AGC CCC TCC AGT CAA GCT AGG-3' /配列番号 : 16)
Q4 137s	(5'-GTT TCC TGA ACG AGC AGT TCG ATC-3' /配列番号 : 37)
Q4 F	(5'-CTG GGC AGG AGC GTG CAG TCA TGC-3' /配列番号 : 25)
Q4 714s	(5'-GCT GCC TCC AGT TGC TTT TGC CTG-3' /配列番号 : 12)
Q4 975s	(5'-GGA CAC AGA CCA GGC ACT GTT GAC-3' /配列番号 : 38)
Q4 E	(5'-GGG TAC AGC GAG CCT TCA TGC AGG-3' /配列番号 : 23)
Q4 K	(5'-TCC TGG CTG TGA AGA GGC TGG TAC-3' /配列番号 : 29)
Q4 H2	(5'-TTA GGA TCC CAG CTT ACC GTA CAG GCT TTG G-3' /配列番号 : 28)
Q4 H1	(5'-TTA GGA TCC GGG GTG CTT GTG GAG TTC AGT G-3' /配列番号 : 27)
Q4 2314s	(5'-CAG GCC AGA CTC CAG GAT TGG GAG-3' /配列番号 : 39)

## 【0070】

そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属の Macintoshコンピュータによりデータを解析した。得られた2人のRTS患者の全長オープンリーディングフレームの塩基配列をDNA SIS塩基配列編集ソフトを用いて、すでに報告したRecQ4 cDNAの塩基配列（特願平9-200387号）と比較した。

## 【0071】

次にゲノムDNAからRecQ4遺伝子のエクソンを増幅するため、2人のRTS患者、I 1.3、II.6およびこれらの両親の培養繊維芽細胞をPBSで洗浄後、TNE buffer (50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 100mM NaCl, 1mM EDTA)に懸濁し、等量のTNE buffer + 2 % SDS + 200  $\mu$ g/ml Proteinase Kを加え、室温で1時間転倒混和した後、42℃で一晩インキュベーションし、DNAの抽出を行った。これを等量のフェノールで抽出することを3回繰り返して除蛋白を行い、続いてエタノール沈殿によりゲノムDNAを得た。このゲノムDNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子の第9、10、11エキソンを含む領域をセンスプライマー-Q4 C8 (5'-GGA AAT GTG CTG GGA AAG GAG-3' / 配列番号: 18)とアンチセンスプライマー-Q4 C5 (5'-ACC AGT GCC TCA GGT GTC A GC-3' / 配列番号: 17)を用いて、またRecQ4遺伝子の第13、14、15エキソンを含む領域をセンスプライマー-Q4 E128 (5'-CTC GAT TCC ATT ATC ATT TAC TGC-3' / 配列番号: 24)とアンチセンスプライマー-Q4 D1 (5'-CTC TTC ACA GCC AGG AA G TCC-3' / 配列番号: 40)を用いてPCRにより増幅した。PCRは95℃ 5分の変性の後、94℃ 30秒（変性）、60℃ 30秒（アニーリング）、72℃ 60秒（伸長）の反応を35サイクル行い、最後に72℃ 5分反応させた。増幅されたDNA断片を精製し、これらを鋳型にしRecQ4遺伝子の第9、10、11エキソンを含む領域にはQ4 C8プライマーを用いて、またRecQ4遺伝子の第13、14、15エキソンを含む領域にはQ4 D3プライマー (5'-AGA GCT GGT GTC CCC GTG GAC-3' / 配列番号: 41)を用いて塩基配列を決定した。塩基配列決定法はHattori ら [Electrophoresis 13, pp560-565 (1992)] により記載された PCRをベースにした方法により行った。即ち、Perkin Elmer社製の蛍光ダイデオキシターミネーターを含有するPRISM

シーケンシングキットを使って反応を行った。そしてApplied Biosystems社製のオートシーケンサー（モデル ABI 373）で塩基配列を読み取り、附属の Macintosh コンピューターによりデータを解析した。得られた患者およびそれらの両親の塩基配列をDNASIS塩基配列編集ソフトで比較した。

#### 【0072】

以上のようなRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の塩基配列の解析により、下記に示すように、この家系の2人のロスムンドートムソン症候群患者は両者とも同じ、ヘテロの変異を有していることが判明した。図1(a)にこのロスムンドートムソン症候群患者の家系図を示し、図1(b)および図2にこの家系の変異解析の結果を示す。

#### 【0073】

1つの変異（mut-1と称する）はエキソン10内に存在し、7塩基の欠失（タンパク質コード領域の塩基配列の1650位から1656位のGGCCTGC（配列番号：3の1734～1740位））（図2(a)）によりそれ以降で読み枠がシフトし、その結果14塩基下流に終結コドンTGAが生じていた。mut-1の変異部位を含むようにプライマーQ4 C 1（5'-TCT GGC CTG CCA CCG TGT CTC-3'／配列番号：42）およびプライマーQ4 C 3（5'-TGG TCA TGC CCG AGT GTA TGC-3'／配列番号：43）を設計し、これらを用いたPCRにより両親のDNA（I.1およびI.2）、および患者のDNA（II.3およびII.6）のRecQ4遺伝子のタンパク質コード領域の残基1624～1675（配列番号：3の1708～1759位）（52bp）の領域を増幅し、得られたDNA断片を15%のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離して変異の解析をおこなった。その結果、mut-1変異の有無を電気泳動における泳動度の差として検出することができた（図1(b)）。この解析の結果、mut-1は母親に由来することが明らかとなった。

#### 【0074】

もう1つの変異（mut-2と称する）は、タンパク質コード領域の残基2269（配列番号：3の2353位）のCがTに変異したもので、もともとのCAG（Gln）がTAG終結コドンに変異していた（図2(b)）。mut-1およびmut-2の両者ともRecQ4ヘリカーゼのヘリカーゼドメインで変異が起こっており、これらの欠損遺伝子の転写産物の翻訳が途中で終結し、コード領域全長から予想されるRecQ4ヘリカーゼの分

子量133kDaに比べ、はるかに小さいタンパク質（それぞれ60kDaおよび82kDa）が生じると予想される。これらの変異解析の結果を表4にまとめ、予想される欠失タンパク質産物を図3に示した。この家系に属する他の被験者から調製したDNAについて同様のシーケンス解析を行った結果、mut-1はロスマンドートムソン症候群患者II.3およびII.6、並びに母親由来のI.2細胞で検出され、mut-2はロスマンドートムソン症候群患者II.3およびII.6、並びに父親由来のI.1細胞で検出された。すなわち、mut-1およびmut-2はそれぞれ母親および父親に由来しており、両方の変異は、表面的には健康な、1つの変異を有する両親から遺伝したことが確認された。

#### 【0075】

この家系に特異的に関連するこれらの変異に加え、ヘテロに複合した別の変異が、米国「National Institute of Aging (NIA)」の「Aging Cell Repository」(No. AG05013)に保管されている、上記の家系とは無関係なロスマンドートムソン症候群患者由来の細胞から見出された。変異の検出方法はRecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームと、RecQ4遺伝子の全てのエキソン領域をPCRにより増幅、塩基配列を決定し、正常な配列と比較することにより行った。RecQ4 cDNAの全長オープンリーディングフレームの増幅、サブクローニング、および塩基配列決定は上述の通りである。またこの患者のRecQ4遺伝子のエクソンを増幅するため、上述の方法でこの患者の繊維芽細胞からゲノムDNAを調製した。このゲノムDNAを鋳型にしてRecQ4遺伝子の第14、15エキソンを含む領域をセンスプライマー-Q4 D3 (5'-AGA GCT GGT GTC CCC GTG GAC-3' /配列番号: 41)とアンチセンスプライマー-Q4 D2 (5'-TGG GAA CAC GCG CTG TAC CAG-3' /配列番号: 44)を用いてPCRにより増幅した。またRecQ4遺伝子の第12、13エキソンを含む領域をセンスプライマー-Q4 D11 (5'-GCC TCA CAC CAC TGC CGC CTC TGG-3' /配列番号: 45)とアンチセンスプライマー-Q4 D12 (5'-GAC AGG CAG ATG GTC AGT GGG ATG-3' /配列番号: 46)を用いてPCRにより増幅した。PCRの条件は上述の通りである。増幅されたDNA断片を精製し、これらを鋳型にしRecQ4遺伝子の第14、15エキソンを含む領域にはQ4 D2プライマーを用いて、またRecQ4遺伝子の第12、13エキソンを含む領域にはQ4 D11プライマーを用いて塩基配列を決定した。その結

果、これらの変異は2塩基の欠損 (mut-3)、およびイントロン12とエキソン13の境界部にあるGがTに変異してスプライシングドナー配列が破壊される変異 (mut-4) であり、両者ともヘリカーゼドメインの下流で翻訳のフレームシフトが起こり、それぞれ881アミノ酸および794アミノ酸からなる欠失したタンパク質産物が生じると予想されることが判明した (表4 および図3)。

【0076】

【表4】

RTS患者細胞で見出されたRecQ4遺伝子の変異				
変異型	変異	エキソン	状況	由来
複合型ヘテロ接合体	1650 7塩基欠失(mut-1)	10	フレームシフト	メキシコ系アメリカ人
	C 2269 T(mut-2)	14	ナンセンス変異	
複合型ヘテロ接合体	2492 2塩基欠失(mut-3)	15	フレームシフト	白人
	3' スプライシング部位	13	フレームシフト	
	AG→AT(mut-4)			

【0077】

mut-1およびmut-2変異を有するロスムンドートムソン症候群患者が、WRNヘリカーゼ遺伝子やBLMヘリカーゼ遺伝子にも変異を持っているか否かを調べるため、II.3細胞およびAG05013細胞のポリ(A)+RNAを逆転写して得たcDNAを鋳型にしてこれらcDNAの全長オープンリーディングフレームをPCRにて増幅し塩基配列の解析を行った。WRN cDNAにおいて増幅した領域はGenBank accession No. L76937で示される188残基～4555残基、またBLM cDNAにおいて増幅した領域はGenBank accession No. U39817で表される57残基～4370残基であった。しかしながら、WRN遺伝子およびBLM遺伝子に変異は見出されなかったことから、WRN遺伝子およびBLM遺伝子はロスムンドートムソン症候群には関与していないと考えられる。以上の結果から、RecQ4遺伝子の変異はロスムンドートムソン症候群に関与しているといえる。さらに、正常WRNヘリカーゼまたは正常BLMヘリカーゼは、ロスムンドートムソン症候群患者においてRecQ4遺伝子の変異により引き起こされる欠損を補うことはできないことが示唆された。

## 【0078】

以上のように本発明者らは、臨床的にロスマンドートムソン症候群と診断された7人の患者のDNAの変異を解析し、同じ家系に属するII.3およびII.6を含め3人の患者からRecQ4遺伝子の変異を見いだした。

## 【0079】

【実施例4】 ロスマンドートムソン症候群患者細胞のノーザンブロット解析

RecQ4遺伝子の変異とロスマンドートムソン症候群の病因との関係を異なる観点から確認するため、5人のロスマンドートムソン症候群患者の細胞におけるRecQ4 mRNAと健常人のそれとの比較をノーザンブロット解析により行った（図4）。患者の繊維芽細胞から、まず全RNAの抽出をAGPC法 [Chomczynski et al., Analytical Biochemistry, 1987, vol. 162, pp156-pp159] により行い、得られた全RNAからオリゴ(dT)ラテックスビーズを用いてpoly(A)+ RNAを精製した。poly(A)+ RNA 5  $\mu$ gを1%のアガロースゲルで電気泳動し、アルカリ変性した後ナイロンフィルターに転写した。RecQ4 cDNAの残基2013～残基2333 (GenBank accession No. AB006532)の321bpの断片をPCRで増幅・精製し、Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2 (宝酒造社製, code no. 6045)を用いて [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTPによりラジオアイソトープ標識したものをプローブとして、フィルターを5×SSPEバッファー、50% ホルムアミド、2% ラウリル硫酸ナトリウム (SDS), 10×デンハート溶液, 100  $\mu$ g/mlサケ精子DNA,  $1 \times 10^7$  cpm/ml [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP標識プローブDNAを含む溶液中で42℃で一晩インキュベーションした。また、フィルターの洗浄は、2×SSC-0.1% SDSで、室温3回行い、続いて0.2×SSC-0.1% SDSで、65℃30分行った。放射活性の検出はBAS1500システム（富士フィルム製）によるオートラジオグラフィーにより行った。

## 【0080】

その結果、約4kbのRecQ4 mRNAのレベルは、健常人の繊維芽細胞（レーン1）に比べII.3由来の繊維芽細胞（レーン2）では有意に減少していた。欠損したmRNAが特異的に減少することは、ウェルナー患者由来の繊維芽細胞やエプスタイン・バー・ウイルス (Epstein-Barr virus) でトランスフォームしたBリンパ芽球様細胞におけるWRN遺伝子の発現でも観察されている (Y. Yamabe et al., Bio

chem. Biophys. Res. Commun. 236:151 (1997))。他の遺伝病においても、ナンセンスコドンは脊椎動物細胞においてRNA代謝に影響を及ぼし、欠損したmRNAの特異的分解が促進され、同様の発現低下調節が起こることが報告されている (L. E. Maquat, RNA 1:456 (1995); L.E. Maquat, Am. J. Hum. Genet. 59:279 (1996))。それに対し、2塩基の欠損と3' スプライス部位の変異をヘテロに複合して有するもう一人の患者 (AG05013) から調製したmRNAのノーザンブロット解析では、正常なサイズと短いサイズの2種のmRNAが検出された (図4、レーン3)。短い方のmRNAは、スプライスドナー部位の変異により異常な選択的スプライシングが起きて生じたもので、この試料におけるRecQ4 mRNAの主要な分子種であると思われる。一方、RecQ4遺伝子に変異が見つからなかった他の4人のロスムンドートムソン症候群患者のうち3人のRecQ4遺伝子の転写産物 (レーン4～6) は、正常人のもの (レーン1) とほとんど同様であった。RecQ4遺伝子の転写産物に関するこれらの結果は、DNA配列の変異解析で得られた結論と一致しており、ロスムンドートムソン症候群患者であるII.3、II.6、およびAG05013はRecQ4遺伝子の変異が原因であることが確認された。

#### 【0081】

ロスムンドートムソン症候群の診断は、これまでのところ、患者と疑われる者に対する、どちらかという広い臨床所見を基に行われており、確実な信頼性の置けるものではなかった。7人のロスムンドートムソン症候群患者のうちRecQ4遺伝子の変異が検出されなかった患者は、他の遺伝子 (群) に変異があるのか、またはロスムンドートムソン症候群との診断が誤っており似たような臨床所見を示す他の病気に属していることが示唆される。また、ロスムンドートムソン症候群の診断に用いられている臨床症状が広すぎるということも考えられる。いわゆるロスムンドートムソン症候群は、類似してはいるがしばしばあいまいな症状を示す患者に対し広く用いられている (E.M. Vennos et al., J. Am. Acad. Dermatol. 27:750 (1992); E.M. Vennos and W.D. James, Dermatol. Clinics. 13:143 (1995))。RecQ4遺伝子配列を用いた遺伝子診断により、ロスムンドートムソン症候群をより正確に診断することができると考えられる。

#### 【0082】

【発明の効果】

本発明により、ロスムンドートムソン症候群はRecQ4ヘリカーゼ遺伝子の変異により生じる遺伝病であることが明らかとなった。これによりRecQ4ヘリカーゼ遺伝子、その配列に基づくプライマー若しくはプローブ、RecQ4ヘリカーゼ、およびその抗体などを利用した、ロスムンドートムソン症候群の確定診断、出生前診断などを含むロスムンドートムソン症候群の検査、および遺伝子治療を含むロスムンドートムソン症候群の治療を行うことが可能となった。

【0083】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AGENE Research Institute, Co., Ltd.

<120> Genes and gene products related to Rothmund-Thomson syndrome

<130> A1-003

<140>

<141>

<160> 46

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 679

<212> DNA



<213> Homo sapiens

<400> 1

agatctcaac gatcatactc gctctgacag gacagaccaa ccgagcactt gtcacgggag 60  
aacaccaaag cagacggcct gccaccaag ggaggcaggc acctccgtgc gacgccccct 120  
ccctcccgcc cggccgcagg gaacgcgacg gtccctcggtc gcctgcgttt cgcgaagacg 180  
ccccgcccc gctcctccgg gcctcgagcc gcgggaggcg ctggaccctc cgctctttcg 240  
cctcccgagc ggggcctgct cctccaggtc ggatgcgtct cccaccaggg cctgacgccg 300  
ctccgaccgg cccggggact ccagtcctt cccgccccgc ggtggcacct ccaggtctcc 360  
cggcctcggc cccgggctcc caaatgcagc cactgcctcc ctccggccagg ccgccccgag 420  
cgaccggtgc cccgccccctt gaggccaggc agggccaggg gcgtgcgccg ccccgctcag 480  
acaccccccc ggccgcccc gctcaccggt cccgcaaccg cagccaccgc ctccagcccc 540  
gcctagaccg tccgccgtc cccgcccggc gccgcggcgc cccgcgatga cgttgacgcc 600  
tcccattggc tgcttgctcg aggcccgacg gactggctgc ccaggggcgg tggccccgcc 660  
cccgccccgc cgcgcattcc 679

<210> 2

<211> 6462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exon

<222> (1)..(168)

<220>

<221> intron

<222> (169)..(233)

<220>

<221> exon

<222> (234)..(267)

<220>

<221> intron

<222> (268)..(360)

<220>

<221> exon

<222> (361)..(455)

<220>

<221> intron

<222> (456)..(678)

<220>

<221> exon

<222> (679)..(819)

<220>

<221> intron

<222> (820)..(1104)

<220>

<221> exon

<222> (1105)..(1881)

<220>

<221> intron

<222> (1882)..(1978)

<220>

<221> exon

<222> (1979)..(2105)

<220>

<221> intron

<222> (2106)..(2411)

<220>

<221> exon

<222> (2412)..(2543)

<220>

<221> intron

<222> (2544)..(2626)

<220>

<221> exon

<222> (2627)..(2719)

<220>

<221> intron

<222> (2720)..(2796)

<220>

<221> exon

<222> (2797)..(2933)

<220>

<221> intron

<222> (2934)..(3343)

<220>

<221> exon

<222> (3344)..(3427)

<220>

<221> intron

<222> (3428)..(3506)

<220>

<221> exon

<222> (3507)..(3680)

<220>

<221> intron

<222> (3681)..(3761)

<220>

<221> exon

<222> (3762)..(3941)

<220>

<221> intron

<222> (3942)..(4043)

<220>

<221> exon

<222> (4044)..(4185)

<220>

<221> intron

<222> (4186)..(4275)

<220>

<221> exon

<222> (4276)..(4538)

<220>

<221> intron

<222> (4539)..(4615)

<220>

<221> exon

<222> (4616)..(4907)

<220>

<221> intron

<222> (4908)..(4982)

<220>

<221> exon

<222> (4983)..(5112)

<220>

<221> intron

<222> (5113)..(5192)

<220>

<221> exon

<222> (5193)..(5362)

<220>

<221> intron

<222> (5363)..(5429)

<220>

<221> exon

<222> (5430)..(5610)

<220>

<221> intron

<222> (5611)..(5686)

<220>

<221> exon

<222> (5687)..(5843)

<220>

<221> intron

<222> (5844)..(5964)

<220>

<221> exon

<222> (5965)..(6073)

<220>

<221> intron

<222> (6074)..(6198)

<220>

<221> exon

<222> (6199)..(6462)

<400> 2

gcattggctg tcggcccccg cgacggctgc gcgggagatt cgctggacga tcgcaagcgc 60

ggaggccggg cgggcgcgcg cgccatggag cggctgcggg acgtgcggga gcggctgcag 120

gcgtgggagc gcgcgttccg acggcagcgc gggcggcgac cgagccaggt gcgggctgcc 180

caggggccga ggggctgagg gcgcggcccc cggtgacgc gttcccttta caggacgacg 240

tggaggcggc gccggaggag acccgcggtg agcgcgcggc ggggcggcgg gggcgagaag 300

acaccgggtc ggcagggggc caggccccac cctgaccccg cctcccgtc gccacgcag 360

cgctctaccg ggagtaccgc actctgaagc gtaccacggg ccaggccggc ggcgggctcc 420

gcagctccga gtcgtctccc gcggcgggccg aagaggtacc caggccccgc cgtcccagcc 480

tcctcccact tccctgtttg gcggagtggc gggagccacg gagtcgcggc caggcctccg 540

tggggcacag aacttgggag ggggactggg caaagtgaag aagggccggg cctcgctcca 600

ggtgcgggag gggctggctgg gagcgcttct gccgccacaa cagccttttc tggcctgtgc 660

ccctgttgtc tcctgcaggc gccagagccc cgctgctggg ggccccatct gaatcgggct 720

gcgaccaaga gtccacagcc tacgccaggg cggagccgcc agggctcggt gccggactac 780

gggcagcggc tcaaggccaa tctgaaaggc accctgcagg tgaggagtgg gcaggcagtg 840

agtcacgct aggtccacag ctgcttccgg tccgggtcgc cctcttgtca tttttccac 900

acagacaggc acgggccctt gtgccaacca gggcacgagt cttcaggag ctctcgggg 960

ccttcgccct tgactccctt tctagtccag ccttgtgcta attagcctgc tctacaattg 1020



agcgtgggga ctcaggtagg ttttagagtc tacagtagct caggggcctg agttcctcct 1080

gctgttctgc tgttccctc ccaggccgga ccagccctgg gccgcagacc gtggcctcta 1140

ggaagagcct catctaaggc atccacccca aagccccag gtacagggcc tgtccctcc 1200

tttgcagaaa aagtcagtga tgagcctcca cagctccctg agccccagcc aaggccaggc 1260

cggctccagc atctgcaggc atccctgagc cagcggctgg gctccctaga tcctggctgg 1320

ttacagcgat gtcacagtga ggtcccagat ttcttggggg ccccaaagc ctgcaggcct 1380

gatctaggct cagaggaatc acaacttctg atccctggtg agtcggctgt ccttggctct 1440

ggtgctggct cccagggcc agaggcttca gccttccaag aagtcagcat ccgtgtgggg 1500

agcccccagc ccagcagcag tggaggcgag aagcggagat ggaacgagga gccctgggag 1560

agccccgcac aggtccagca ggagagcagc caagctggac ccccatcgga gggggctggg 1620

gctgtagcag ttgaggaaga cctccaggg gaacctgtac aggcacagcc acctagccc 1680

tgcagcagcc catcgaaccc caggtaccac ggactcagcc cctccagtca agctagggct 1740

gggaaggctg agggcacagc cccctgcac atcttccctc ggctggcccg ccatgacagg 1800

ggcaattacg tacggctcaa catgaagcag aaacactacg tgcggggccg ggcactccgt 1860

agcaggctcc tccgcaagca ggtaagacag cgacgggccca ggacaggcat tccctttccc 1920

tccccctcagc cctcccgtat ttcccgccca gtgaccctcc tatgtgggca cccccaggc 1980

atggaagcag aagtggcgga agaaagggga gtgttttggg ggtggtggtg ccacagtcac 2040

aaccaaggag tcttgtttcc tgaacgagca gttcgatcac tgggcagccc agtgtccccg 2100

gccagggtgag acatctgccc tggaggggtg gtccggccaa cactgtggag agggcgccagt 2160

gtcttttttg gggacactta tgttccaagc aacaggcctt ccaggtaccc ctggtccagg 2220

ccctacccta gctcccctga aggaggggtg cagggacgac gatggctgtc actcttttct 2280

gctttggaaa aagtagccca gaggaagggc actgcctgct gccaaccccc ttggggggaa 2340

ggagaggttg tggccagtgg ttgtcttgcc cgacctggag ctcccattct accctctcct 2400

gcctgcccc acaagtgagg aagacacaga tgcgtgtggg cctgagccac tggttccctc 2460

accacaacct gtacctgagg tgcccagcct ggaccccacc gtgctgccac tctactccct 2520

ggggccctca gggcagttgg caggtgagca gtcagcttct ggcccagagc cttcactgag 2580

gggttggggg gactcaagtc atggtgatca acatctgtgt ctgcagagac gccggctgag 2640

gtgttccagg ccctggagca gctggggcac caagccttcc gccctgggca ggagcgtgca 2700

gtcatgcgga tcctgtctgg tgagcgtggc tgccagggct gaggctgggc tgaggccagg 2760

ctgcagaacc ctgctgctga ccccccccc atccaggcat ctccacgctg ctgggtgctgc 2820

ctacaggctgc cggcaagtcc ctgtgctacc agctcccagc gctgctctac agccggcgca 2880

gccccctgcct cacgttggc gctctcccc tgcgtgctact catggatgac cagggtgtgca 2940

cacagggccc tgggcacacg tacacagcca agaaccagca cttgtgactc ccaagggcaa 3000

ctgctgcttg tcccctaacc accccctccc ctgggagctt caaggtgtct gtggcctcag 3060

tcccagtctt ggcagcaggt caaaggcagc ccagctccac aggcaccaca gccaccctta 3120

cgggaaatgt gctgggaaag gagccatccc tacttcagtc tgtctgctct ggggctcctg 3180

ggccaaggcc cacaggtggc tctaaaccct tagccctagg acccaggacc tggttctcct 3240

ctcccctgag ggactaggat ggacatggca gcagatctgg gatgacttgg ggaagggcca 3300

gggctgggct ggcgtatgac ggctgtcgtt cctgcatttg cagggtgtctg gcctgccacc 3360

gtgtctcaag gcggcctgca tacactcggg catgaccagg aagcaacggg aatctgtcct 3420

gcagaaggctg ggggcctcat gggcctaggg gtgaggagg cagcgggcgg gcacctgggc 3480

tgtgcctctg atcttgctgc cttcagattc gggcagccca ggtacacgtg ctgatgctga 3540

cacctgaggc actggtgggg gcgggaggcc tccctccagc cgcacagctg cctccagttg 3600

cttttgcctg cattgatgag gccactgcc tctcccagtg gtcccacaac ttccggccct 3660

gctacctgcg cgtctgcaag gtgagccata tgtgaactgg ggtgggcggc cagggccggg 3720

atgggctggg cggcctcaca ccactgccgc ctctgggtgca ggtgcttcgg gagcgcatgg 3780

gcgtgcactg cticctgggc ctacagcca cagccacacg ccgcactgcc agtgacgtgg 3840

cacagcacct ggctgtggct gaagagcctg acctccacgg gccagcccca gtteccacca 3900

acctgcacct ttccgtgtcc atggacaggg acacagacca ggtgggtgtg tgtgctctgg 3960

ggaccctgca gggccctggc tgcctgactgc ccacgccgac cctcctcac tccccactgc 4020

ccacgccaac cgtcctcat caggcactgt tgacgctgct gcaaggcaaa cgttttcaaa 4080

acctcgattc cattatcatt tactgcaacc ggcgcgagga cacagagcgg atcgctgcgc 4140

tcctccgaac ctgcctgcac gcagcctggg tcccagggtc tggaggtgcg gcatggacag 4200

agctgggtgtc cccgtggacc caccttgggc acacatggtc ccatcccact gaccatctgc 4260

ctgtcttccc caaaggtcgt gccccaaaa ccacagccga ggcctaccac gcgggcatgt 4320

gcagccggga acggcggcgg gtacagcgag ccttcattgca gggccagttg cgggtggtgg 4380

tggccacggt ggcctttggg atggggctgg accggccaga tgtcgggct gtgctgcac 4440

tggggctgcc cccaagcttc gagagctacg tgcaggccgt gggccgggcc gggcgtgacg 4500

ggcagcctgc ccactgccac ctcttcctgc agccccaggt tggcaccccc cccccacact 4560

gccagtgctc gagccccag tggccaccc caccctcatg aaagttgccc tgcagggcga 4620

agacctgcga gagctgcga gacatgtgca cgccgacagc acggacttcc tggctgtgaa 4680

gaggctggta cagcgcgtgt tcccagcctg cacctgcacc tgcaccaggc cgccctcgga 4740

gcaggaaggg gccgtgggtg gggagaggcc tgtgcccaag tccccccctc aagaggctga 4800

gcagcttagc caccaagcag ccccaggacc cagaagggtc tgcatgggcc atgagcgggc 4860

actcccaata cagcttaccg tacaggcttt ggacatgccg gaggagggtg aggaacctgg 4920

ggtaagccac aggggtgtgg aggggctgtc cccgcgtccg ctgagccctg ctctgcccc 4980

agccatcgag actttgctgt gctacctgga gctgcacca caccactggc tggagctgct 5040

ggcgaccacc tataccatt gccgtctgaa ctgccctggg ggccctgccc agctccaggc 5100

cctggccac aggtaagcac gccctgccc gttggagacg aggttgaga atcagggctg 5160

ttggccacat gtcccttttt cctgggcac aggtgtcccc ctttggtgt gtgcttgcc 5220

cagcagctgc ctgaggacc agggcaaggc agcagctccg tggagtttga catggtcaag 5280

ctggtggact ccatgggctg ggagctggcc tctgtgcggc gggctctctg ccagctgcag 5340

tgggaccacg agcccaggac aggtgcgcct ctccccacc caccgcgcc tggacgtgc 5400

ctgcctgcat ctgacatgct ttccggcagg tgtgcggcgt gggacagggg tgcttggtga 5460

gttcagttag ctggccttcc accttcgcag cccgggggac ctgaccgctg aggagaagga 5520

ccagatatgt gacttcctct atggccgtgt gcaggcccgg gagcgccagg ccctggcccc 5580

tctgcgcaga accttccagg cctttcacag gttagggagga ggtgggcggg gcctgggacc 5640

atccaccctc ccgcagtgat cagctctgac aggctcctcc ccacagcgta gccttcccca 5700

gctgcgggcc ctgcctggag cagcaggatg aggagcgcag caccaggctc aaggacctgc 5760

tcggccgcta ctttgaggaa gaggaagggc aggagccggg aggcatggag gacgcacagg 5820

gccccgagcc agggcaggcc agagttagtg tagtaaggcc aggcagctca tcgggggttc 5880

aggttccctg ggctgcatgg ggcttgctct gtggatgcag tgccacggga gctcagagga 5940

agcctgatgt gcctgtccac acagctccag gattgggagg accaggctcg ctgcgacatc 6000

cgccagtacc tgtccctgag gccagaggag aagtctcca gcagggtgt ggcccgcac 6060

ttccacggca tcggtgaggc ctgggaggcc ccacccactg caggctgggg ctgggggctg 6120

gggcaggatga ggcctgggag gctccaccg ctgcaggctg gggctggggc tcacggctgt 6180

gtcttggtc caccgtagga agcccctgt acccgccca ggtgtacggg caggaccgac 6240

gcttctggag aaaatacctg cacctgagct tccatgccct ggtgggcctg gccacggaag 6300

agctcctgca ggtggcccg tgactgcact gcattggggg atgtcgggta gagctggggt 6360

tgtcagaggc tagggcagtg actgaggacc tgggcaaaac ctgccacagg gtgtgggaac 6420

gaggaggctc caaaatgcag aataaaaaat gctcactttg tt 6462

<210> 3

<211> 3850

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (85)..(3708)

<400> 3

gcattggctg tcggcccccg cgacggctgc gcgggagatt cgctggacga tcgcaagcgc 60

ggaggccggg cgggcgcgcg cgcc atg gag cgg ctg cgg gac gtg cgg gag 111

Met Glu Arg Leu Arg Asp Val Arg Glu

1

5

cgg ctg cag gcg tgg gag cgc gcg ttc cga cgg cag cgc ggg cgg cga 159

Arg Leu Gln Ala Trp Glu Arg Ala Phe Arg Arg Gln Arg Gly Arg Arg

10

15

20

25

ccg agc cag gac gac gtg gag gcg gcg ccg gag gag acc cgc gcg ctc 207  
Pro Ser Gln Asp Asp Val Glu Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu

30

35

40

tac cgg gag tac cgc act ctg aag cgt acc acg ggc cag gcc ggc ggc 255  
Tyr Arg Glu Tyr Arg Thr Leu Lys Arg Thr Thr Gly Gln Ala Gly Gly

45

50

55

ggg ctc cgc agc tcc gag tcg ctc ccc gcg gcg gcc gaa gag gcg cca 303  
Gly Leu Arg Ser Ser Glu Ser Leu Pro Ala Ala Ala Glu Glu Ala Pro

60

65

70

gag ccc cgc tgc tgg ggg ccc cat ctg aat cgg gct gcg acc aag agt 351  
Glu Pro Arg Cys Trp Gly Pro His Leu Asn Arg Ala Ala Thr Lys Ser

75

80

85

cca cag cct acg cca ggg cgg agc cgc cag ggc tcg gtg ccg gac tac 399  
Pro Gln Pro Thr Pro Gly Arg Ser Arg Gln Gly Ser Val Pro Asp Tyr

90

95

100

105

ggg cag cgg ctc aag gcc aat ctg aaa ggc acc ctg cag gcc gga cca 447  
Gly Gln Arg Leu Lys Ala Asn Leu Lys Gly Thr Leu Gln Ala Gly Pro

110

115

120

gcc ctg ggc cgc aga ccg tgg cct cta gga aga gcc tca tct aag gca 495  
Ala Leu Gly Arg Arg Pro Trp Pro Leu Gly Arg Ala Ser Ser Lys Ala

125

130

135

tcc acc cca aag ccc cca ggt aca ggg cct gtc ccc tcc ttt gca gaa 543



Ser Thr Pro Lys Pro Pro Gly Thr Gly Pro Val Pro Ser Phe Ala Glu  
140 145 150

aaa gtc agt gat gag cct cca cag ctc cct gag ccc cag cca agg cca 591  
Lys Val Ser Asp Glu Pro Pro Gln Leu Pro Glu Pro Gln Pro Arg Pro  
155 160 165

ggc cgg ctc cag cat ctg cag gca tcc ctg agc cag cgg ctg ggc tcc 639  
Gly Arg Leu Gln His Leu Gln Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu Gly Ser  
170 175 180 185

cta gat cct ggc tgg tta cag cga tgt cac agt gag gtc cca gat ttt 687  
Leu Asp Pro Gly Trp Leu Gln Arg Cys His Ser Glu Val Pro Asp Phe  
190 195 200

ctg ggg gcc ccc aaa gcc tgc agg cct gat cta ggc tca gag gaa tca 735  
Leu Gly Ala Pro Lys Ala Cys Arg Pro Asp Leu Gly Ser Glu Glu Ser  
205 210 215

caa ctt ctg atc cct ggt gag tcg gct gtc ctt ggt cct ggt gct ggc 783  
Gln Leu Leu Ile Pro Gly Glu Ser Ala Val Leu Gly Pro Gly Ala Gly  
220 225 230

tcc cag ggc cca gag gct tca gcc ttc caa gaa gtc agc atc cgt gtg 831  
Ser Gln Gly Pro Glu Ala Ser Ala Phe Gln Glu Val Ser Ile Arg Val  
235 240 245

ggg agc ccc cag ccc agc agc agt gga ggc gag aag cgg aga tgg aac 879  
Gly Ser Pro Gln Pro Ser Ser Ser Gly Gly Glu Lys Arg Arg Trp Asn

250	255	260	265	
gag gag ccc tgg gag agc ccc gca cag gtc cag cag gag agc agc caa				927
Glu Glu Pro Trp Glu Ser Pro Ala Gln Val Gln Gln Glu Ser Ser Gln				
	270	275	280	
gct gga ccc cca tcg gag ggg gct ggg gct gta gca gtt gag gaa gac				975
Ala Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ala Gly Ala Val Ala Val Glu Glu Asp				
	285	290	295	
cct cca ggg gaa cct gta cag gca cag cca cct cag ccc tgc agc agc				1023
Pro Pro Gly Glu Pro Val Gln Ala Gln Pro Pro Gln Pro Cys Ser Ser				
	300	305	310	
cca tcg aac ccc agg tac cac gga ctc agc ccc tcc agt caa gct agg				1071
Pro Ser Asn Pro Arg Tyr His Gly Leu Ser Pro Ser Ser Gln Ala Arg				
	315	320	325	
gct ggg aag gct gag ggc aca gcc ccc ctg cac atc ttc cct cgg ctg				1119
Ala Gly Lys Ala Glu Gly Thr Ala Pro Leu His Ile Phe Pro Arg Leu				
	330	335	340	345
gcc cgc cat gac agg ggc aat tac gta cgg ctc aac atg aag cag aaa				1167
Ala Arg His Asp Arg Gly Asn Tyr Val Arg Leu Asn Met Lys Gln Lys				
	350	355	360	
cac tac gtg cgg ggc cgg gca ctc cgt agc agg ctc ctc cgc aag cag				1215
His Tyr Val Arg Gly Arg Ala Leu Arg Ser Arg Leu Leu Arg Lys Gln				
	365	370	375	

gca tgg aag cag aag tgg cgg aag aaa ggg gag tgt ttt ggg ggt ggt 1263

Ala Trp Lys Gln Lys Trp Arg Lys Lys Gly Glu Cys Phe Gly Gly Gly

380

385

390

ggt gcc aca gtc aca acc aag gag tct tgt ttc ctg aac gag cag ttc 1311

Gly Ala Thr Val Thr Thr Lys Glu Ser Cys Phe Leu Asn Glu Gln Phe

395

400

405

gat cac tgg gca gcc cag tgt ccc cgg cca gca agt gag gaa gac aca 1359

Asp His Trp Ala Ala Gln Cys Pro Arg Pro Ala Ser Glu Glu Asp Thr

410

415

420

425

gat gct gtt ggg cct gag cca ctg gtt cct tca cca caa cct gta cct 1407

Asp Ala Val Gly Pro Glu Pro Leu Val Pro Ser Pro Gln Pro Val Pro

430

435

440

gag gtg ccc agc ctg gac ccc acc gtg ctg cca ctc tac tcc ctg ggg 1455

Glu Val Pro Ser Leu Asp Pro Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ser Leu Gly

445

450

455

ccc tca ggg cag ttg gca gag acg ccg gct gag gtg ttc cag gcc ctg 1503

Pro Ser Gly Gln Leu Ala Glu Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu

460

465

470

gag cag ctg ggg cac caa gcc ttt cgc cct ggg cag gag cgt gca gtc 1551

Glu Gln Leu Gly His Gln Ala Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Val

475

480

485

atg cgg atc ctg tct ggc atc tcc acg ctg ctg gtg ctg cct aca ggt 1599

Met Arg Ile Leu Ser Gly Ile Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly

490 495 500 505

gcc ggc aag tcc ctg tgc tac cag ctc cca gcg ctg ctc tac agc cgg 1647

Ala Gly Lys Ser Leu Cys Tyr Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ser Arg

510 515 520

cgc agc ccc tgc ctc acg ttg gtc gtc tct ccc ctg ctg tca ctc atg 1695

Arg Ser Pro Cys Leu Thr Leu Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met

525 530 535

gat gac cag gtg tct ggc ctg cca ccg tgt ctc aag gcg gcc tgc ata 1743

Asp Asp Gln Val Ser Gly Leu Pro Pro Cys Leu Lys Ala Ala Cys Ile

540 545 550

cac tcg ggc atg acc agg aag caa cgg gaa tct gtc ctg cag aag att 1791

His Ser Gly Met Thr Arg Lys Gln Arg Glu Ser Val Leu Gln Lys Ile

555 560 565

cgg gca gcc cag gta cac gtg ctg atg ctg aca cct gag gca ctg gtg 1839

Arg Ala Ala Gln Val His Val Leu Met Leu Thr Pro Glu Ala Leu Val

570 575 580 585

ggg gcg gga ggc ctc cct cca gcc gca cag ctg cct cca gtt gct ttt 1887

Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro Ala Ala Gln Leu Pro Pro Val Ala Phe

590 595 600

gcc tgc att gat gag gcc cac tgc ctc tcc cag tgg tcc cac aac ttc 1935

Ala Cys Ile Asp Glu Ala His Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe  
605 610 615

cgg ccc tgc tac ctg cgc gtc tgc aag gtg ctt cgg gag cgc atg ggc 1983  
Arg Pro Cys Tyr Leu Arg Val Cys Lys Val Leu Arg Glu Arg Met Gly  
620 625 630

gtg cac tgc ttc ctg ggc ctc aca gcc aca gcc aca cgc cgc act gcc 2031  
Val His Cys Phe Leu Gly Leu Thr Ala Thr Ala Thr Arg Arg Thr Ala  
635 640 645

agt gac gtg gca cag cac ctg gct gtg gct gaa gag cct gac ctc cac 2079  
Ser Asp Val Ala Gln His Leu Ala Val Ala Glu Glu Pro Asp Leu His  
650 655 660 665

ggg cca gcc cca gtt ccc acc aac ctg cac ctt tcc gtg tcc atg gac 2127  
Gly Pro Ala Pro Val Pro Thr Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp  
670 675 680

agg gac aca gac cag gca ctg ttg acg ctg ctg caa ggc aaa cgt ttt 2175  
Arg Asp Thr Asp Gln Ala Leu Leu Thr Leu Leu Gln Gly Lys Arg Phe  
685 690 695

caa aac ctc gat tcc att atc att tac tgc aac cgg cgc gag gac aca 2223  
Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Glu Asp Thr  
700 705 710

gag cgg atc gct gcg ctc ctc cga acc tgc ctg cac gca gcc tgg gtc 2271  
Glu Arg Ile Ala Ala Leu Leu Arg Thr Cys Leu His Ala Ala Trp Val

715

720

725

cca ggg tct gga ggt cgt gcc ccc aaa acc aca gcc gag gcc tac cac 2319

Pro Gly Ser Gly Gly Arg Ala Pro Lys Thr Thr Ala Glu Ala Tyr His

730

735

740

745

gcg ggc atg tgc agc cgg gaa cgg cgg cgg gta cag cga gcc ttc atg 2367

Ala Gly Met Cys Ser Arg Glu Arg Arg Arg Val Gln Arg Ala Phe Met

750

755

760

cag ggc cag ttg cgg gtg gtg gtg gcc acg gtg gcc ttt ggg atg ggg 2415

Gln Gly Gln Leu Arg Val Val Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly

765

770

775

ctg gac cgg cca gat gtg cgg gct gtg ctg cat ctg ggg ctg ccc cca 2463

Leu Asp Arg Pro Asp Val Arg Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro

780

785

790

agc ttc gag agc tac gtg cag gcc gtg ggc cgg gcc ggg cgt gac ggg 2511

Ser Phe Glu Ser Tyr Val Gln Ala Val Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly

795

800

805

cag cct gcc cac tgc cac ctc ttc ctg cag ccc cag ggc gaa gac ctg 2559

Gln Pro Ala His Cys His Leu Phe Leu Gln Pro Gln Gly Glu Asp Leu

810

815

820

825

cga gag ctg cgc aga cat gtg cac gcc gac agc acg gac ttc ctg gct 2607

Arg Glu Leu Arg Arg His Val His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala

830

835

840

gtg aag agg ctg gta cag cgc gtg ttc cca gcc tgc acc tgc acc tgc 2655  
Val Lys Arg Leu Val Gln Arg Val Phe Pro Ala Cys Thr Cys Thr Cys

845

850

855

acc agg ccg ccc tcg gag cag gaa ggg gcc gtg ggt ggg gag agg cct 2703  
Thr Arg Pro Pro Ser Glu Gln Glu Gly Ala Val Gly Gly Glu Arg Pro

860

865

870

gtg ccc aag tac ccc cct caa gag gct gag cag ctt agc cac caa gca 2751  
Val Pro Lys Tyr Pro Pro Gln Glu Ala Glu Gln Leu Ser His Gln Ala

875

880

885

gcc cca gga ccc aga agg gtc tgc atg ggc cat gag cgg gca ctc cca 2799  
Ala Pro Gly Pro Arg Arg Val Cys Met Gly His Glu Arg Ala Leu Pro

890

895

900

905

ata cag ctt acc gta cag gct ttg gac atg ccg gag gag gcc atc gag 2847  
Ile Gln Leu Thr Val Gln Ala Leu Asp Met Pro Glu Glu Ala Ile Glu

910

915

920

act ttg ctg tgc tac ctg gag ctg cac cca cac cac tgg ctg gag ctg 2895  
Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu Leu His Pro His His Trp Leu Glu Leu

925

930

935

ctg gcg acc acc tat acc cat tgc cgt ctg aac tgc cct ggg ggc cct 2943  
Leu Ala Thr Thr Tyr Thr His Cys Arg Leu Asn Cys Pro Gly Gly Pro

940

945

950

gcc cag ctc cag gcc ctg gcc cac agg tgt ccc cct ttg gct gtg tgc 2991  
Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala His Arg Cys Pro Pro Leu Ala Val Cys

955

960

965

ttg gcc cag cag ctg cct gag gac cca ggg caa ggc agc agc tcc gtg 3039  
Leu Ala Gln Gln Leu Pro Glu Asp Pro Gly Gln Gly Ser Ser Ser Val

970

975

980

985

gag ttt gac atg gtc aag ctg gtg gac tcc atg ggc tgg gag ctg gcc 3087  
Glu Phe Asp Met Val Lys Leu Val Asp Ser Met Gly Trp Glu Leu Ala

990

995

1000

tct gtg cgg cgg gct ctc tgc cag ctg cag tgg gac cac gag ccc agg 3135  
Ser Val Arg Arg Ala Leu Cys Gln Leu Gln Trp Asp His Glu Pro Arg

1005

1010

1015

aca ggt gtg cgg cgt ggg aca ggg gtg ctt gtg gag ttc agt gag ctg 3183  
Thr Gly Val Arg Arg Gly Thr Gly Val Leu Val Glu Phe Ser Glu Leu

1020

1025

1030

gcc ttc cac ctt cgc agc ccg ggg gac ctg acc gct gag gag aag gac 3231  
Ala Phe His Leu Arg Ser Pro Gly Asp Leu Thr Ala Glu Glu Lys Asp

1035

1040

1045

cag ata tgt gac ttc ctc tat ggc cgt gtg cag gcc cgg gag cgc cag 3279  
Gln Ile Cys Asp Phe Leu Tyr Gly Arg Val Gln Ala Arg Glu Arg Gln

1050

1055

1060

1065

gcc ctg gcc cgt ctg cgc aga acc ttc cag gcc ttt cac agc gta gcc 3327



Ala Leu Ala Arg Leu Arg Arg Thr Phe Gln Ala Phe His Ser Val Ala  
1070 1075 1080

ttc ccc agc tgc ggc ccc tgc ctg gag cag cag gat gag gag cgc agc 3375  
Phe Pro Ser Cys Gly Pro Cys Leu Glu Gln Gln Asp Glu Glu Arg Ser  
1085 1090 1095

acc agg ctc aag gac ctg ctc ggc cgc tac ttt gag gaa gag gaa ggg 3423  
Thr Arg Leu Lys Asp Leu Leu Gly Arg Tyr Phe Glu Glu Glu Glu Gly  
1100 1105 1110

cag gag ccg gga ggc atg gag gac gca cag ggc ccc gag cca ggg cag 3471  
Gln Glu Pro Gly Gly Met Glu Asp Ala Gln Gly Pro Glu Pro Gly Gln  
1115 1120 1125

gcc aga ctc cag gat tgg gag gac cag gtc cgc tgc gac atc cgc cag 3519  
Ala Arg Leu Gln Asp Trp Glu Asp Gln Val Arg Cys Asp Ile Arg Gln  
1130 1135 1140 1145

ttc ctg tcc ctg agg cca gag gag aag ttc tcc agc agg gct gtg gcc 3567  
Phe Leu Ser Leu Arg Pro Glu Glu Lys Phe Ser Ser Arg Ala Val Ala  
1150 1155 1160

cgc atc ttc cac ggc atc gga agc ccc tgc tac ccg gcc cag gtg tac 3615  
Arg Ile Phe His Gly Ile Gly Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr  
1165 1170 1175

ggg cag gac cga cgc ttc tgg aga aaa tac ctg cac ctg agc ttc cat 3663  
Gly Gln Asp Arg Arg Phe Trp Arg Lys Tyr Leu His Leu Ser Phe His

1180

1185

1190

gcc ctg gtg ggc ctg gcc acg gaa gag ctc ctg cag gtg gcc cgc 3708

Ala Leu Val Gly Leu Ala Thr Glu Glu Leu Leu Gln Val Ala Arg

1195

1200

1205

tgactgcact gcattggggg atgtcgggta gagctggggt tgtcagaggc tagggcagtg 3768

actgaggacc tgggcaaaac ctgccacagg gtgtgggaac gaggaggctc caaaatgcag 3828

aataaaaaat gtcactttg tt 3850

<210> 4

<211> 1208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Arg Leu Arg Asp Val Arg Glu Arg Leu Gln Ala Trp Glu Arg

1

5

10

15

Ala Phe Arg Arg Gln Arg Gly Arg Arg Pro Ser Gln Asp Asp Val Glu

20

25

30

Ala Ala Pro Glu Glu Thr Arg Ala Leu Tyr Arg Glu Tyr Arg Thr Leu

35

40

45

Lys Arg Thr Thr Gly Gln Ala Gly Gly Gly Leu Arg Ser Ser Glu Ser

50

55

60

Leu Pro Ala Ala Ala Glu Glu Ala Pro Glu Pro Arg Cys Trp Gly Pro

65

70

75

80

His Leu Asn Arg Ala Ala Thr Lys Ser Pro Gln Pro Thr Pro Gly Arg

85

90

95

Ser Arg Gln Gly Ser Val Pro Asp Tyr Gly Gln Arg Leu Lys Ala Asn

100

105

110

Leu Lys Gly Thr Leu Gln Ala Gly Pro Ala Leu Gly Arg Arg Pro Trp

115

120

125

Pro Leu Gly Arg Ala Ser Ser Lys Ala Ser Thr Pro Lys Pro Pro Gly

130

135

140

Thr Gly Pro Val Pro Ser Phe Ala Glu Lys Val Ser Asp Glu Pro Pro

145

150

155

160

Gln Leu Pro Glu Pro Gln Pro Arg Pro Gly Arg Leu Gln His Leu Gln

165

170

175

Ala Ser Leu Ser Gln Arg Leu Gly Ser Leu Asp Pro Gly Trp Leu Gln

180

185

190

Arg Cys His Ser Glu Val Pro Asp Phe Leu Gly Ala Pro Lys Ala Cys

195

200

205

Arg Pro Asp Leu Gly Ser Glu Glu Ser Gln Leu Leu Ile Pro Gly Glu

210

215

220

Ser Ala Val Leu Gly Pro Gly Ala Gly Ser Gln Gly Pro Glu Ala Ser

225

230

235

240

Ala Phe Gln Glu Val Ser Ile Arg Val Gly Ser Pro Gln Pro Ser Ser

245

250

255

Ser Gly Gly Glu Lys Arg Arg Trp Asn Glu Glu Pro Trp Glu Ser Pro

260

265

270

Ala Gln Val Gln Gln Glu Ser Ser Gln Ala Gly Pro Pro Ser Glu Gly

275

280

285

Ala Gly Ala Val Ala Val Glu Glu Asp Pro Pro Gly Glu Pro Val Gln

290

295

300

Ala Gln Pro Pro Gln Pro Cys Ser Ser Pro Ser Asn Pro Arg Tyr His

305

310

315

320

Gly Leu Ser Pro Ser Ser Gln Ala Arg Ala Gly Lys Ala Glu Gly Thr

325

330

335

Ala Pro Leu His Ile Phe Pro Arg Leu Ala Arg His Asp Arg Gly Asn

340

345

350

Tyr Val Arg Leu Asn Met Lys Gln Lys His Tyr Val Arg Gly Arg Ala

355

360

365

Leu Arg Ser Arg Leu Leu Arg Lys Gln Ala Trp Lys Gln Lys Trp Arg  
370 375 380

Lys Lys Gly Glu Cys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Thr Val Thr Thr Lys  
385 390 395 400

Glu Ser Cys Phe Leu Asn Glu Gln Phe Asp His Trp Ala Ala Gln Cys  
405 410 415

Pro Arg Pro Ala Ser Glu Glu Asp Thr Asp Ala Val Gly Pro Glu Pro  
420 425 430

Leu Val Pro Ser Pro Gln Pro Val Pro Glu Val Pro Ser Leu Asp Pro  
435 440 445

Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Gly Gln Leu Ala Glu  
450 455 460

Thr Pro Ala Glu Val Phe Gln Ala Leu Glu Gln Leu Gly His Gln Ala  
465 470 475 480

Phe Arg Pro Gly Gln Glu Arg Ala Val Met Arg Ile Leu Ser Gly Ile  
485 490 495

Ser Thr Leu Leu Val Leu Pro Thr Gly Ala Gly Lys Ser Leu Cys Tyr  
500 505 510

Gln Leu Pro Ala Leu Leu Tyr Ser Arg Arg Ser Pro Cys Leu Thr Leu

515

520

525

Val Val Ser Pro Leu Leu Ser Leu Met Asp Asp Gln Val Ser Gly Leu

530

535

540

Pro Pro Cys Leu Lys Ala Ala Cys Ile His Ser Gly Met Thr Arg Lys

545

550

555

560

Gln Arg Glu Ser Val Leu Gln Lys Ile Arg Ala Ala Gln Val His Val

565

570

575

Leu Met Leu Thr Pro Glu Ala Leu Val Gly Ala Gly Gly Leu Pro Pro

580

585

590

Ala Ala Gln Leu Pro Pro Val Ala Phe Ala Cys Ile Asp Glu Ala His

595

600

605

Cys Leu Ser Gln Trp Ser His Asn Phe Arg Pro Cys Tyr Leu Arg Val

610

615

620

Cys Lys Val Leu Arg Glu Arg Met Gly Val His Cys Phe Leu Gly Leu

625

630

635

640

Thr Ala Thr Ala Thr Arg Arg Thr Ala Ser Asp Val Ala Gln His Leu

645

650

655

Ala Val Ala Glu Glu Pro Asp Leu His Gly Pro Ala Pro Val Pro Thr

660

665

670

Asn Leu His Leu Ser Val Ser Met Asp Arg Asp Thr Asp Gln Ala Leu  
675 680 685

Leu Thr Leu Leu Gln Gly Lys Arg Phe Gln Asn Leu Asp Ser Ile Ile  
690 695 700

Ile Tyr Cys Asn Arg Arg Glu Asp Thr Glu Arg Ile Ala Ala Leu Leu  
705 710 715 720

Arg Thr Cys Leu His Ala Ala Trp Val Pro Gly Ser Gly Gly Arg Ala  
725 730 735

Pro Lys Thr Thr Ala Glu Ala Tyr His Ala Gly Met Cys Ser Arg Glu  
740 745 750

Arg Arg Arg Val Gln Arg Ala Phe Met Gln Gly Gln Leu Arg Val Val  
755 760 765

Val Ala Thr Val Ala Phe Gly Met Gly Leu Asp Arg Pro Asp Val Arg  
770 775 780

Ala Val Leu His Leu Gly Leu Pro Pro Ser Phe Glu Ser Tyr Val Gln  
785 790 795 800

Ala Val Gly Arg Ala Gly Arg Asp Gly Gln Pro Ala His Cys His Leu  
805 810 815

Phe Leu Gln Pro Gln Gly Glu Asp Leu Arg Glu Leu Arg Arg His Val  
820 825 830

His Ala Asp Ser Thr Asp Phe Leu Ala Val Lys Arg Leu Val Gln Arg  
835 840 845

Val Phe Pro Ala Cys Thr Cys Thr Cys Thr Arg Pro Pro Ser Glu Gln  
850 855 860

Glu Gly Ala Val Gly Gly Glu Arg Pro Val Pro Lys Tyr Pro Pro Gln  
865 870 875 880

Glu Ala Glu Gln Leu Ser His Gln Ala Ala Pro Gly Pro Arg Arg Val  
885 890 895

Cys Met Gly His Glu Arg Ala Leu Pro Ile Gln Leu Thr Val Gln Ala  
900 905 910

Leu Asp Met Pro Glu Glu Ala Ile Glu Thr Leu Leu Cys Tyr Leu Glu  
915 920 925

Leu His Pro His His Trp Leu Glu Leu Leu Ala Thr Thr Tyr Thr His  
930 935 940

Cys Arg Leu Asn Cys Pro Gly Gly Pro Ala Gln Leu Gln Ala Leu Ala  
945 950 955 960

His Arg Cys Pro Pro Leu Ala Val Cys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Glu  
965 970 975

Asp Pro Gly Gln Gly Ser Ser Ser Val Glu Phe Asp Met Val Lys Leu



980

985

990

Val Asp Ser Met Gly Trp Glu Leu Ala Ser Val Arg Arg Ala Leu Cys

995

1000

1005

Gln Leu Gln Trp Asp His Glu Pro Arg Thr Gly Val Arg Arg Gly Thr

1010

1015

1020

Gly Val Leu Val Glu Phe Ser Glu Leu Ala Phe His Leu Arg Ser Pro

1025

1030

1035

1040

Gly Asp Leu Thr Ala Glu Glu Lys Asp Gln Ile Cys Asp Phe Leu Tyr

1045

1050

1055

Gly Arg Val Gln Ala Arg Glu Arg Gln Ala Leu Ala Arg Leu Arg Arg

1060

1065

1070

Thr Phe Gln Ala Phe His Ser Val Ala Phe Pro Ser Cys Gly Pro Cys

1075

1080

1085

Leu Glu Gln Gln Asp Glu Glu Arg Ser Thr Arg Leu Lys Asp Leu Leu

1090

1095

1100

Gly Arg Tyr Phe Glu Glu Glu Glu Gly Gln Glu Pro Gly Gly Met Glu

1105

1110

1115

1120

Asp Ala Gln Gly Pro Glu Pro Gly Gln Ala Arg Leu Gln Asp Trp Glu

1125

1130

1135

Asp Gln Val Arg Cys Asp Ile Arg Gln Phe Leu Ser Leu Arg Pro Glu

1140

1145

1150

Glu Lys Phe Ser Ser Arg Ala Val Ala Arg Ile Phe His Gly Ile Gly

1155

1160

1165

Ser Pro Cys Tyr Pro Ala Gln Val Tyr Gly Gln Asp Arg Arg Phe Trp

1170

1175

1180

Arg Lys Tyr Leu His Leu Ser Phe His Ala Leu Val Gly Leu Ala Thr

1185

1190

1195

1200

Glu Glu Leu Leu Gln Val Ala Arg

1205

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 5

tcacaacttc tgatccctgg tgag

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 6

gagggtcttc ctcaactgct acag

24

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 7

caatgggagg cgtcaacgct atcg

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 8

gaggcgaaag agcggagggt ccag

24

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 9

cgcttctgga gaaaatacct gcac

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 10

ttggagcctc ctcgttccca cacc

24

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 11

gtttcctgaa cgagcagttc gatc

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 12

gctgcctcca gttgcttttg cctg

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 13

ttggtcgcag cccgattcag atgg

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 14

tggcccgtgg tacgcttcag agtg

24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 15

gacggctgcg cgggagattc gctg

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 16

ctcagcccct ccagtcaagc tagg

24

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 17

accagtcct caggtgtcag c

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 18

ggaaatgtgc tgggaaagga g

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 19

accaagagtc cacagcctac g

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 20

gctccgtgga gtttgacatg g

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 21

agcgcagcac caggctcaag g

21

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 22

gcactgcttc ctgggcctca cagc

24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 23

gggtacagcg agccttcattg cagg

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 24

ctcgattcca ttatcattta ctgc

24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 25

ctgggcagga gcgtgcagtc atgc

24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 26

aggggagaga cgaccaacgt gagg

24

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 27

ttaggatccg gggcgcttgt ggagttcagt g

31

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 28

ttaggatccc agcttaccgt acaggctttg g

31

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 29

tcctggctgt gaagaggctg gtac

24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

synthesized primer sequence

<400> 30

atcccccaat gcagtgcagt cagc

24

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 31

aatctgggac ctcactgtga catc

24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 32

agggtgcctt tcagattggc cttg

24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 33

agattcgctg gacgatcgca agcg

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 34

caggttttgc ccaggtcctc agtc

24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 35

gtcactgccc tagcctctga caac

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 36

tcatctaagg catccacccc aaag

24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 37

gtttcctgaa cgagcagttc gatc

24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 38

ggacacagac caggcactgt tgac

24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 39

caggccagac tccaggattg ggag

24

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 40

ctcttcacag ccaggaagtc c

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 41

agagctggtg tccccgtgga c

21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 42

tctggcctgc caccgtgtct c

21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 43

tggtcatgcc cgagtgtatg c

21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 44

tggaacacg cgctgtacca g

21

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 45

gcctcacacc actgccgcct ctgg

24

<210> 46

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 46

gacaggcaga tggtcagtgg gatg

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) はロスムンドートムソン症候群患者およびその家族の家系図を示す図である。Iは親を表し、1は父親、2は母親を表す。半分が黒い四角および丸はRecQ4遺伝子の1つのアレルに変異を持つ保因者を表す。IIはその兄弟姉妹(1~6)を表す。全て黒い四角(II.3、男性)および丸(II.6、女性)はロスムンドートムソン症候群患者を表し、RecQ4遺伝子の2つのアレル両方に変異を持つ。II.2、II.4、およびII.5はロスムンドートムソン症候群患者ではないので解析されていない。影付きで表したII.1は、臨床所見による診断ではロスムンドートムソン症候群患者と診断される。

(b) はロスムンドートムソン症候群患者およびその両親のRecQ4遺伝子の変異解析の結果を表す図である。レーンI.1は父親、レーンI.2は母親、レーンII.3は患者II.3、レーンII.6は患者II.6の結果を表す。これらの結果から、母親にはその親から遺伝した1つのアレルに7塩基の欠失(mut-1)があることがわかった。

【図 2】

RecQ4遺伝子の変異領域の直接塩基配列解析の結果を表す図である。

(a) にはmut-1を含む領域(タンパク質コード領域の残基1641~1672)の塩基配列を、正常および変異RecQ4遺伝子について示した。mut-1(7塩基欠失)の取り囲む領域を、健常人並びにロスムンドートムソン症候群患者II.2およびII.6

より調製したゲノムDNAを用いてPCRにより増幅し、塩基配列を解析した。正常および変異配列を、シーケンス結果の下に示した。

(b) にはmut-2を含む領域(タンパク質コード領域の残基2257~2280)の塩基配列を、正常および変異RecQ4遺伝子について示した。mut-2(CからTへの変異)の取り囲む領域を、健常人並びにロスンドートムソン症候群患者II.2およびII.6より調製したゲノムDNAを用いてPCRにより増幅し、(a)と同様に解析した。

### 【図3】

mut-1~mut-4により生じる欠失RecQ4ヘリカーゼ分子の模式図である。「正常」はクローニングされたRecQ4遺伝子のコード領域から予想される、1208アミノ酸の完全なRecQ4ヘリカーゼを表す。影を付けた領域は全てのRecQヘリカーゼで保存されているヘリカーゼドメインを表す。

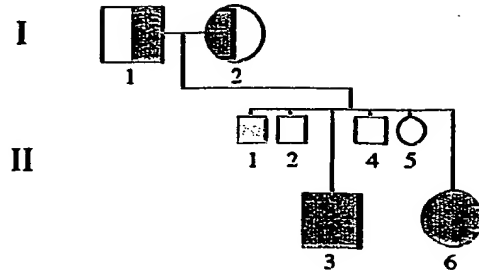
### 【図4】

ロスンドートムソン症候群患者細胞におけるRecQ4遺伝子発現の抑制的調節を調べた結果を示す図である。ロスンドートムソン症候群患者由来の細胞のRecQ4遺伝子の転写産物を、健常人のそれらと比較した。RecQ4遺伝子に変異が見られたロスンドートムソン症候群患者(II.3、AG05013)、RecQ4遺伝子に変異を持たない他の3人のロスンドートムソン症候群患者(NIA, Aging Cell Repository由来のAG05139およびAG03587A、並びにR. Miller博士より供与されたTC4398)、および健常人に由来する皮膚繊維芽細胞からポリ(A)<sup>+</sup> RNAを調製し、RecQ4遺伝子のヘリカーゼドメインから調製したプローブを用いてノーザンブロット解析を行った。内部標準としてGAPDH mRNAを用いた測定も行った。レーン1は健常人、レーン2はII.3、レーン3はAG05013、レーン4はAG05139、レーン5はAG03587、レーン6はTC4398の結果である。

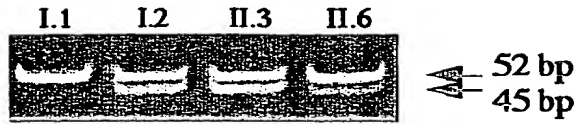
【書類名】 図面

【図 1】

**A**



**B**

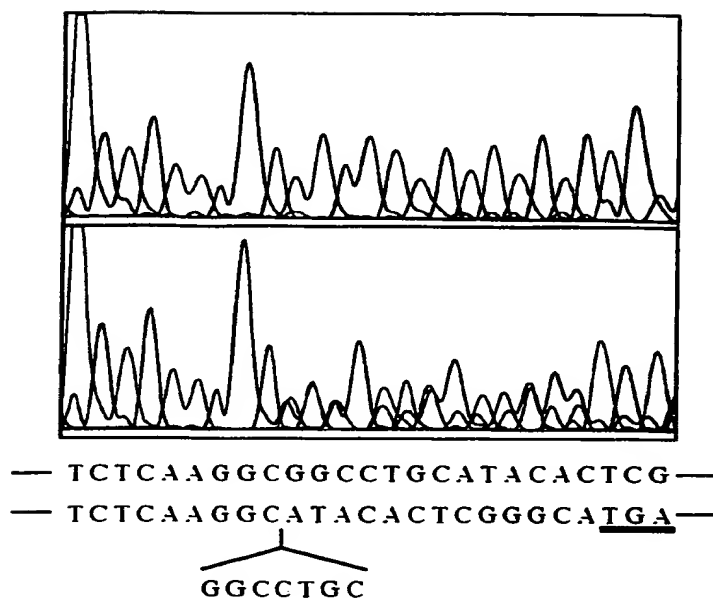


【図 2】

(a)

正常型

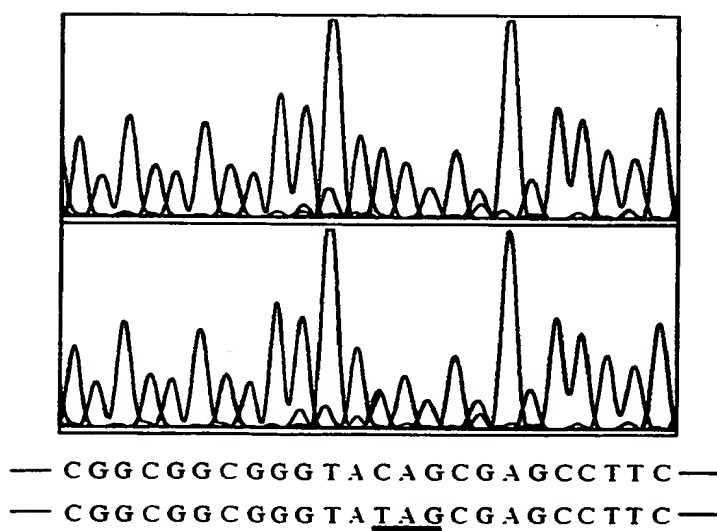
mut-1



(b)

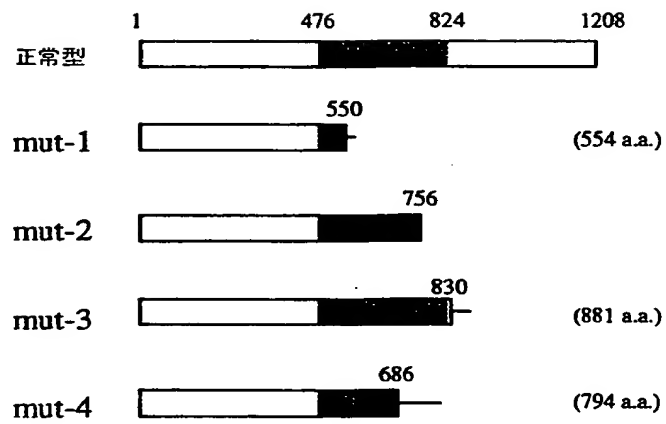
正常型

mut-2

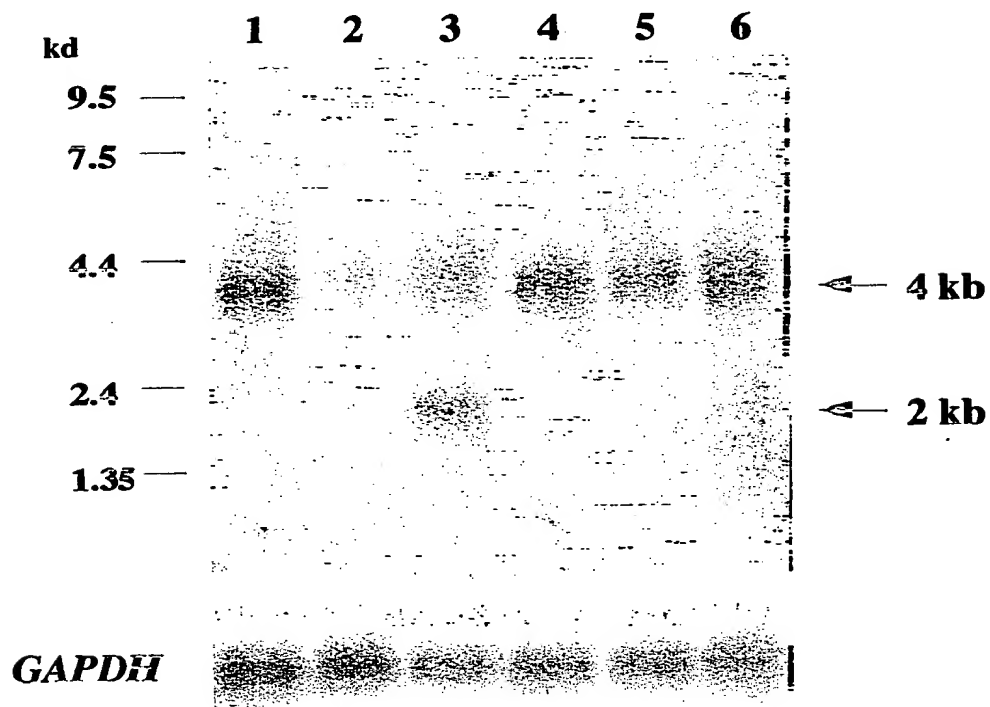




【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子の解明、並びに該疾患の変異の検査方法、検査薬、および治療薬を提供することを課題とする。

【解決手段】 RecQヘリカーゼ遺伝子ファミリーに属するRecQ4ヘリカーゼ遺伝子が、ロスムンドートムソン症候群の原因遺伝子であることを解明した。この遺伝子に変異が存在するか否かを検出することにより、ロスムンドートムソン症候群の検査を行うことが可能であることを見出した。さらに、正常なRecQ4ヘリカーゼ遺伝子やそのタンパク質等を利用して、ロスムンドートムソン症候群患者の治療を行うことが可能であることを見出した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 6 0 1 3 8 8 8 ]

1. 変更年月日 1 9 9 6 年 1 月 3 1 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地  
氏 名 株式会社エイジーン研究所

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**